

Aus der
Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Untersuchungen zum Vorkommen von Chlamydien in Eileiter und Uterus
des Schweines und deren mögliche Bedeutung für das Infertilitätsgeschehen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Grit Hoffmann
aus Schlema

Leipzig, 2007

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. Axel Sobiraj

Gutachter: Prof. Dr. Axel Sobiraj
Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik der Veterinär-
medizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig

Prof. Dr. Michael Wendt
Klinik für kleine Klauentiere, forensische Medizin und
ambulatorische Klinik der Tierärztlichen Hochschule Hannover,
Hannover

PD Dr. Dr. Petra Reinhold
Institut für molekulare Pathogenese, Friedrich-Löffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Jena

Tag der Verteidigung: 28. August 2007

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Morphologie und Funktion des Eileiters.....	3
2.1.1	Topographie und makroskopischer Aufbau des Eileiters	3
2.1.2	Histologischer Aufbau des Eileiters	3
2.2	Morphologie und Funktion der Uterus	4
2.2.1	Topographie und makroskopischer Aufbau des Uterus	4
2.2.2	Histologischer Aufbau der Uterus	5
2.3	Chlamydien	7
2.3.1	Taxonomie.....	7
2.3.2	Historischer Überblick	10
2.3.3	Entwicklungszyklus	11
2.3.4	Morphologie	13
2.3.5	Antigenetische Eigenschaften	15
2.3.6	Diagnostische Verfahren	15
2.3.6.1	Histochemischer Erregernachweis	15
2.3.6.2	Nachweis durch den Tierversuch	15
2.3.6.3	Erreger-Anzüchtung	16
2.3.6.4	Methoden, die auf dem Nachweis von Antigen basieren.....	17
2.3.6.5	Methoden, die auf dem Nachweis von Antikörpern basieren	18
2.3.6.6	Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken (NAT).....	19
2.3.6.7	Weitere Nachweismethoden.....	21
2.3.7	Chlamydiale Infektionen des Genitaltraktes	21
2.3.7.1	Beim Menschen.....	21
2.3.7.2	Beim Schwein	23
2.3.7.3	Beim Wiederkäuer.....	24
2.3.7.4	Beim Pferd.....	25

3	Tiere, Material und Methoden	26
3.1	Tiere, Reproduktionsmanagement, Gesundheitsstatus	26
3.2	Gewinnung, Einteilung und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials	27
3.3	Makroskopische Untersuchungen der Genitalien	29
3.4	Untersuchungen auf Chlamydien mittels direktem Immunfluoreszenztest	30
3.5	Untersuchungen auf Chlamydien mittels Polymerase-Chain-Reaction	32
3.5.1	DNA-Isolation und PCR	32
3.5.2	Sequenzierreaktion	35
3.6	Histologische Untersuchungen der Genitalien	36
3.6.1	Histologische Untersuchungen des Uterus	37
3.6.2	Histologische Untersuchungen des Eileiters	40
3.7	Mikrobiologische Untersuchungen	42
3.8	Mykotoxikologische Untersuchungen	45
3.9	Statistische Auswertungen	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Ergebnisse der makroskopischen Untersuchungen	47
4.2	Ergebnisse der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen	48
4.3	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen	51
4.4	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen	56
4.4.1	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Uteri	56
4.4.2	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Eileiter	60
4.5	Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen	64
4.6	Ergebnisse der mykotoxikologischen Untersuchungen	65
5	Diskussion	66
5.1	Vergleich von Polymerase-Kettenreaktion und Immunfluoreszenztest	67
5.2	Prävalenz und Bedeutung	68
5.3	Chlamydienspezies	71
5.4	Lokalisation	72
5.5	Ergebnisse der histologischen Untersuchung	73

5.6	Bakteriologische und mykotoxikologische Untersuchungsergebnisse	75
5.7	Schlussfolgerungen.....	76
6	Zusammenfassung	78
7	Summary	80
8	Literaturverzeichnis	82

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
AL	Ampulle links
Anon.	Anonymus
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
AR	Ampulle rechts
AS	Altsau
ATP	Adenosintriphosphat
BGM	Buffalo Green Monkey
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar (<u>b</u> ase <u>p</u> air)
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Chlamydia</i>
C	Cytosin
° C	Grad Celcius
ca.	circa
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Cp.	<i>Chlamydomphila</i>
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EB	<u>e</u> lementary <u>b</u> ody (Elementarkörperchen)
EBE	Einschlussbildende Einheiten
eCG	equine chorion gonadotropin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL	Eileiter
ELISA	<u>e</u> zyme <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay
et al.	et alii

Abkürzungsverzeichnis

Fa.	Firma
G	Guanin
ggr.	Geringgradig
GnRH	Gonadotropin-Releasinghormon
h	Stunde(n)
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
hgr.	hochgradig
HPLC	High performance liquid chromatography
I	Inosin
IFT	Immunfluoreszenztest
IL	Isthmus links
IR	Isthmus rechts
JS	Jungsau
K	degeneriertes Nukleotid (Wobble) Guanin/Thymin
KB	künstliche Besamung
KBR	Komplement-Bildungs-Reaktion
kDa	Kilo-Dalton
Kol.	Kolonien
LD	Leaderpeptid
LPS	Lipopolysaccharid
M	degeneriertes Nukleotid (Wobble) Adenin/Cytosin
ME	umsetzbare Energie
mg	Milligramm
mgr.	mittelgradig
min	Minute(n)
MJ	Megajoule
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MOMP	<u>m</u> ajor <u>o</u> uter <u>m</u> embrane <u>p</u> roteine
n	Probenanzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information
neg.	negativ

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
n.u.	nicht untersucht
PAP-Methode	Peroxidase-Antiperoxidase-Methode
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	Pondus Hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PID	pelvic inflammatory disease
pmol	Picomol
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
POD	polyzystische Ovardegeneration
pos.	positive
PRRS	porcine reproductive and respiratory syndrome
R	degeneriertes Nukleotid (Wobble) Adenin/Guanin
RB	reticulate body (Retikularkörperchen)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
<i>Sc.</i>	<i>Streptococcus</i>
s	Sekunde(n)
spp.	Spezies
SPSS	statistical package for social scientifics
<i>Staph.</i>	<i>Staphylococcus</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Trisbase-Borsäure-EDTA-Puffer
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TU-	negatives Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung
TU+	positives Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung
u.a.	unter anderem / und andere

Abkürzungsverzeichnis

UTVL	uterotubale Verbindung links
UTVR	uterotubale Verbindung rechts
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
VD	variable Domäne
Vol.	Volumen
VT	Volumenteile
W	degeneriertes Nukleotid (Wobble) Adenin/Thymin
Y	degeneriertes Nukleotid (Wobble) Cytosin/Thymin
z.B.	zum Beispiel
Σ	Summe
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
%	Prozent

1 Einleitung

Weltweit treten Infektionen mit Chlamydien bei den verschiedensten Tierarten und beim Menschen auf und verursachen eine Vielzahl von Erkrankungen. Besonders in der Humanmedizin haben Chlamydieninfektionen in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Neben der in Entwicklungsländern verbreiteten Trachomerkrankung, kommen in den Industrieländern vor allem Infektionen des Genitaltraktes vor. Die Infektion tritt akut, chronisch oder intermittierend, häufig jedoch klinisch inapparent auf. Bei der Frau ascendieren die Chlamydien nach einer oftmals symptomlosen Infektion der Zervix über den Uterus in die Eileiter, wo die Chlamydien über Jahre hinweg zu einem vollständigen Funktionsverlust der Tuben und somit zur tubalen Sterilität führen können. Im Hinblick auf Fruchtbarkeitsstörungen und Abortgeschehen erlangt die Chlamydieninfektion auch in der Veterinärmedizin zunehmend an Bedeutung. Welche Rolle die Chlamydieninfektion der Haus- und Nutztiere insbesondere als Ursache von Fruchtbarkeitsstörungen spielt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Sowohl bei Rindern als auch bei Stuten konnten Chlamydien aus Abortmaterial isoliert werden (BOCKLISCH et al. 1991, HENNING et al. 2000, POSPISCHIL et al. 2002b). Bei der Stute wurden Chlamydien im Eileiter nachgewiesen und mit entzündlichen Prozessen assoziiert (MEDENBACH et al. 1999). Als Folgen der Chlamydieninfektion im Genitaltrakt von Sauen werden Mumifikation (DANIELS et. al. 1994), Aborte (SHERBAN et al. 1972, 1978, SCHILLER et. al. 1997, THOMA et. al. 1997), perinatale Mortalität (DANIELS et. al. 1994), Endometritis (BUSCH et. al. 2000), Vaginalausfluss (EGGEMANN et al. 2000) und mehrfaches Umrauschen (CAMENISCH et. al. 2004, WITTENBRINK 1991) beschrieben. Serologische Studien zeigten eine relativ hohe Prävalenz von Chlamydieninfektionen in Schweinezuchtbeständen (33% EGGEMANN et. al. 2000; 61,7% CAMENISCH et. al. 2004). In einer Vielzahl von Studien wurden Chlamydien im Uterus von Sauen nachgewiesen (BANGE 2000, BUSCH et. al. 2000, EGGEMANN et. al. 2000, HOELZLE et. al. 2000, CAMENISCH et. al. 2004). Dagegen gibt es bisher nur wenige Angaben über das Vorkommen von Chlamydien im Eileiter von Sauen (BUSCH et. al. 2000, CAMENISCH et. al. 2004).

Ziel der vorliegenden Arbeit war, mit Hilfe verschiedener Techniken Chlamydien im Eileiter und im Uterus klinisch unauffälliger, reproduktionsgestörter Sauen nachzuweisen und zu identifizieren. Parallel dazu erfolgte eine Untersuchung der Organe von trächtigen Sauen. Die Organe wurden zudem histologisch untersucht, um zu eruieren ob Chlamydieninfektionen pathologische Veränderungen hervorrufen. Die Abklärung möglicher Differentialdiagnosen

erfolgte durch die bakteriologische und zum Teil durch die mykotoxikologische Untersuchung.

2 Literaturübersicht

2.1 Morphologie und Funktion des Eileiters

2.1.1 Topographie und makroskopischer Aufbau des Eileiters

Bei nicht graviden Tieren ist der paarig vorkommende Eileiter (lateinisch: *Tuba uterina*, griechisch: *Salpinx*) im Becken lokalisiert und verläuft stark geschlängelt von der Medialwand der *Bursa ovarica* auf die laterale Fläche des Mesosalpinx. Der zum Ovar hin offene Abschnitt des Eileiters, das *Infundibulum tubae uterinae*, soll die Eizelle nach der Ovulation aufnehmen. Die Ränder des *Infundibulum tubae uterinae* tragen unregelmäßige Fortsätze, *Fimbriae tubae*, die zum Teil mit dem Ovar verwachsen sind, *Fimbriae ovaricae*. Der Eileitertrichter ist mit der *Ampulla tubae uterinae* über das *Ostium abdominale tubae uterinae* verbunden. In der *Salpinx* vollzieht sich die zweite Reifeteilung der Eizelle. Am Übergang von der Ampulle zum Isthmus (Ampulla-Isthmus-Verbindung;) erfolgt die Befruchtung (HUNTER 1984, MICHEL et al. 1986). Der erweiterte Anfangsteil, die *Ampulla tubae uterinae* und der sich anschließende, eben noch für die Eizelle passierbare *Isthmus tubae uterinae*, sind zusammen 190-220 mm lang (SCHUMMER u. VOLLMERHAUS 1995). In diesen beiden Abschnitten verweilt das befruchtete Ei, durchläuft mehrere Stadien der Furchung und erreicht den Uterus fünf Tage nach der Ovulation (SCHNORR 1996, HAFEZ u. HAFEZ 2000). Über die uterotubale Verbindung (*Pars uterina tubae*) mit seinem *Ostium uterinum tubae* mündet der *Salpinx* in die Spitze des Uterushornes.

2.1.2 Histologischer Aufbau des Eileiters

Der Eileiter ist ein häutig-muskulöser Schlauch. Er besteht aus Mukosa, Muskularis und Serosa von innen nach außen. Insbesondere die Schleimhaut der *Ampullae tubae uterinae* weist zahlreiche Sekundär- und Tertiärfalten (*Plicae tubariae*) auf, die im *Isthmus tubae uterinae* zum Uterus hin abnehmen. Diese starke Schleimhautfaltung dient der Oberflächenvergrößerung, die für die Ernährung der Eizelle bzw. des Embryos und der Spermien benötigt wird (SMOLLICH u. MICHEL 1992). Die Schleimhaut trägt ein einschichtiges iso- bis hochprismatisches, stellenweise mehrstufiges Epithel, das sich aus kinozilienbesetzten Flimmerzellen, Mikrovilli tragenden Drüsenzellen und Stiftchenzellen zusammensetzt. Charakteristisch für die Zilienzellen sind ein helles Zytoplasma und ein großer Kern. Sie kommen vor allem im Infundibulum und in der Ampulla zahlreich vor. Die mit Mikrozotten ausgestatteten Zilienzellen sorgen für einen uteruswärts gerichteten

Flimmerstrom. Die Drüsenzellen enthalten Sekretgranula und sind an ihren ins Lumen ragenden Zellkuppen zu erkennen. Außerdem zählen zu den Epithelzellen die dunklen, zwischen den anderen Zellen eingekeilten Stiftchenzellen, die degenerieren und eine Art „Abraumzelle“ im Sinne der Zellmauserung darstellen. Das Gegenstück dazu sind kleine, basal gelegene Zellen („Basalzellen“); sie sorgen für den Zellersatz. Zur *Tunica mucosa* zählt neben dem Epithel die *Lamina propria mucosae*, in der viele freie Zellen, wie Plasmazellen, Mastzellen und eosinophile Granulozyten vorkommen und in lockeres Bindegewebe eingebettet sind (LEISER 1990).

Das Epithel des Eileiters unterliegt zyklischen Veränderungen. So überwiegen im Diöstrus besonders Zilienzellen, im Östrus dagegen zilienfreie Zellen (SMOLLICH u. MICHEL 1992). Während der Brunst kann eine deutliche Sekretion beobachtet werden. Das Sekret ist schleimartig und glykoproteinreich. Es liefert Nährstoffe für Eizelle und Embryo sowie Spermien und enthält einen Faktor, der für die Spermien zur Erlangung ihrer Befruchtungsfähigkeit (Kapazitation) notwendig ist (SMOLLICH u. MICHEL 1992). Die aus glatter Muskulatur bestehende *Tunica muscularis* setzt sich vor allem aus zirkulären zusammen, enthält aber auch longitudinale und schräge Faserbündel und variiert je nach Eileiterabschnitt in seiner Dicke. Im Ampullenbereich ist die *Tunica muscularis* verhältnismäßig dünn, im Isthmus dagegen stark ausgebildet. Neben dem uteruswärts gerichteten Flimmerstrom sind die Kontraktionen der *Tunica muscularis* am Transport der Eizelle beteiligt. Durch Antiperistaltik werden die Spermien Richtung Oozyte transportiert (LEISER 1990). Die äußere Hülle des Eileiters stellt die Serosa dar, in deren Subserosa zahlreiche Blutgefäße eingebettet sind. Die Serosa geht in das Eileitergekröse (Mesosalpinx) über, das gemeinsam mit dem Mesovarium und dem Mesometrium Bestandteil des *Ligamentum latum uteri* ist. Durch sympathische Nervenfasern wird die *Tuba uterina* innerviert.

2.2 Morphologie und Funktion des Uterus

2.2.1 Topographie und makroskopischer Aufbau des Uterus

Der Uterus (lateinisch: *Uterus*; griechisch: *Metra*) dient neben dem Transit der Spermien, der Nidation, Implantation und Plazentation sowie der Versorgung und Entwicklung des Embryos bzw. Fetus (SMOLLICH u. MICHEL 1992). Nach Abschluss der Gravidität ist die Gebärmutter mit der Austreibung der Frucht betraut. Durch das in der Uterusschleimhaut

synthetisierte und luteolytisch wirkende Prostaglandin $F_{2\alpha}$ werden das *Corpus luteum graviditatis* und das *Corpus luteum periodicum* abgebaut. Da der Uterus beim Schwein zwei Hörner aufweist, wird von einem *Uterus bicornis* gesprochen. Eine *Portio vaginalis cervicis* fehlt. Als Verschluss gegenüber der Scheide fungieren deshalb die im Lumen des Gebärmutterhalses (*Cervix uteri*) angeordneten Verschlusskissen (*Pulvini cervicales*). Lediglich der kaudale Teil der *Cervix uteri* liegt im retroperitonealen Raum. Diesem schließt sich der in kranioventraler Richtung in die Bauchhöhle ziehende Uteruskörper (*Corpus uteri*) an. Durch eine von kranial hineinragende Scheidewand wird der Uteruskörper teilweise getrennt (*Uterus bicornis subseptus*). Die zu dünndarmähnlichen Windungen zusammengegriffen Uterushörner schieben sich zwischen die Dünndarmschlingen und können so die ventrale Bauchwand erreichen (SCHUMMER u. VOLLMERHAUS 1995).

Die Schleimhaut des Uterus (Endometrium; *Tunica mucosa*) bildet unterschiedlich hohe, verstreichbare Falten, die im Bereich des Körpers besonders hoch sein können. Sie liegt der Uterusmuskulatur (*Tunica muscularis*) an, dessen äußerer Anteil in das Mesometrium zieht, wo sie die Serosamuskulatur darstellt und für die Bewegung des Aufhängeapparates des Uterus verantwortlich ist. Umschlossen wird der Uterus vom Perimetrium, einem Bauchfellüberzug, der vom Mesometrium übertritt. Als Parametrium wird das gefäß- und nervenreiche Bindegewebe des *Ligamentum latum uteri* bezeichnet (SCHUMMER u. VOLLMERHAUS 1995).

2.2.2 Histologischer Aufbau des Uterus

Die Schleimhaut des Uterus ist die innenständige Auskleidung des Uteruslumens. Sie unterliegt starken zyklusabhängigen morphologischen Veränderungen und besitzt luminal ein einschichtiges Oberflächenepithel. Aufgrund von enormer Proliferation kann es während des Zyklus auch zwei- bis mehrstufig sein (SMOLLICH u. MICHEL 1992). In der Zeit zwischen Proöstrus und Metöstrus sind die Epithelzellen hochprismatisch, im Diöstrus dagegen kubisch. Den Epithelzellverband bilden Mikrovilli- oder Sekretionszellen und Zilienzellen sowie intraepithelial lokalisierte Lymphozyten, die eine Barriere zwischen dem antigenhaltigem Lumen und den lymphoretikulären Abwehreleinrichtungen der Propria der Schleimhaut darstellen. Während der Proliferationsphase (Proöstrus und Östrus), hyperplasieren die Drüsen. Es sind zahlreiche Mitosen sichtbar. Die Zellen besitzen große euchromatinhaltige Kerne. Heterochromatinreiche kleine Kerne und Vakuolen sowie Sekretgranula sind Anzeichen der Sekretionsphase, wie sie im Met- und Diöstrus zu

beobachten ist. Es ist vor allem das aus den Corpora lutea stammende Progesteron, das die Uterindrüsen zur Sekretion anregt.

Dem Oberflächenepithel folgt die *Lamina propria mucosae*, die vor allem Uterindrüsen und zellreiches, faserarmes *Stroma endometrialis* umfasst. Hier sind besonders subepithelial zahlreiche Immunzellen anzutreffen, wie z.B. Mikrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen und während der Brunst zusätzlich auch Mastzellen. Dieser unmittelbar subepitheliale Bereich wird aufgrund seines Zellreichtums auch als *Stratum cellulare* bezeichnet. Die zellärmere Region der *Lamina propria mucosae*, das *Stratum reticulare*, besteht aus Retikulin- und Kollagenfasern. Unter dem Einfluss der Steroide Estradiol und Progesteron variieren amorphe und flüssige Bestandteile der Interzellulärsubstanz in ihrem Anteil, so dass in Abhängigkeit von der Zyklusphase (und der jeweils vorherrschenden hormonellen Situation) ein unterschiedlicher Ödematisierungsgrad zu beobachten ist. Die Uterindrüsen (*Glandulae uterinae*) sind beim Schwein vor allem im Endabschnitt stark geschlängelt und werden von einem einschichtigen hochprismatischen Epithel gebildet. In Phasen hoher Östrogenkonzentrationen, d.h. im Proöstrus, Östrus und z.T. auch im Metöstrus, proliferieren die Uterindrüsen, was mit einer Verengung der Lumina einhergeht. Unter Progesteroneinfluss wird die Sekretion gefördert, ist im mittleren Diöstrus am stärksten ausgeprägt, im späten Diöstrus jedoch nicht mehr nachzuweisen (LEISER 1990). Die Drüsen sind während der Sekretionsphase stark geschlängelt, erscheinen erweitert und weisen mit mukoidem Sekret gefüllte Lumina auf. Menge und Zusammensetzung der Drüsensekrete variieren zyklusabhängig. Das Sekret der Uterindrüsen stellt den Hauptanteil der Uterinmilch dar, die für die Versorgung des Embryos notwendig ist.

Die *Tunica muscularis*, das Myometrium, setzt sich aus einer inneren zirkulären Schicht (*Stratum circulare*) und einer äußeren longitudinalen zusammen (SCHUMMER u. VOLLMERHAUS 1995). Beide Muskelschichten bilden ein Spiralsystem, dass sowohl die Ausdehnung des Uterus während der Trächtigkeit als auch ein rasches Zusammenziehen post partum gewährleistet. Nach kranial setzt sich das *Stratum circulare* in die Eileitermuskulatur fort, während es kaudal in die Zervikalmuskulatur übergeht. Anteile der longitudinal verlaufenden Fasern stellen kaudal die Scheidenmuskulatur dar und verstärken die Tela subserosa. Ein *Stratum vasculare*, das bei anderen Haussäugetieren (Wiederkäuer, Pferd, Hund und Katze) zwischen beiden Muskelschichten eingebettet ist, fehlt dem Schwein (SCHUMMER u. VOLLMERHAUS 1995). Die äußere Hülle bildet das Perimetrium, das aus einem einschichtigen Plattenepithel (Mesothel) und einer lockeren Bindegewebsschicht

aufgebaut ist. In diesem Bindegewebe verlaufen Blut- und Lymphgefäße sowie sympathische und parasympathische Nervenfasern.

Die Schleimhaut der Cervix uteri weist ein kompliziertes Faltensystem auf. Es besteht aus Längs- und Querfalten (Primär-, Sekundär- und Tertiärfalten) und dient dem Verschluss und der Öffnung der Gebärmutter. Ein zäher Schleimpfropf, der von den Zellen des einschichtigen hochprismatischen Cervixepithels gebildet wird, trägt zusätzlich zum Verschluss der Cervix bei.

2.3 Chlamydien

2.3.1 Taxonomie

Chlamydien gehören zu den Eubakterien (WEISBURG et al. 1986) und bilden eine eigene Ordnung innerhalb dieser Bakterien. Nach der bis 1999 üblichen Taxonomie (Abb. 1) umfasste die Familie *Chlamydiaceae* nur eine Gattung (*Chlamydia*) und die Spezies *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia trachomatis* (GRAYSTON et al. 1989) und *Chlamydia pneumoniae* (FUKUSHI u. HIRAI 1992). Die ursprüngliche Differenzierung verschiedener Chlamydienspezies erfolgte aufgrund ihrer Morphologie, dem Glykogengehalt der chlamydialen Einschlusskörperchen, der Antigenstruktur der Zellwand und dem Wirtsspektrum (MOULDER 1988). Im Jahre 1999 wurde eine neue taxonomische Einteilung vorgeschlagen (Abb. 1) (EVERETT et al. 1999a). Grund waren phylogenetische Analysen insbesondere des 16S- und des 23S rRNA-Gens, von EVERETT et al. (1999a), die andere als die bisherigen Verwandtschaftsverhältnisse suggerierten und in Untersuchungen weiterer Gensequenzdaten (für GroEL-Chaperonin, KDO-Transferase, Small Cysteine-Rich Lipoprotein, Large Cystein-Rich 60 kDa Proteins) Bestätigung fanden (EVERETT 2000). Dieser Einteilung zufolge umfasst die Ordnung der *Chlamydiales* jetzt 4 Familien: *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* und *Waddliaceae*. Die Familie der *Chlamydiaceae* enthält die Genera *Chlamydia* und *Chlamydophila*.

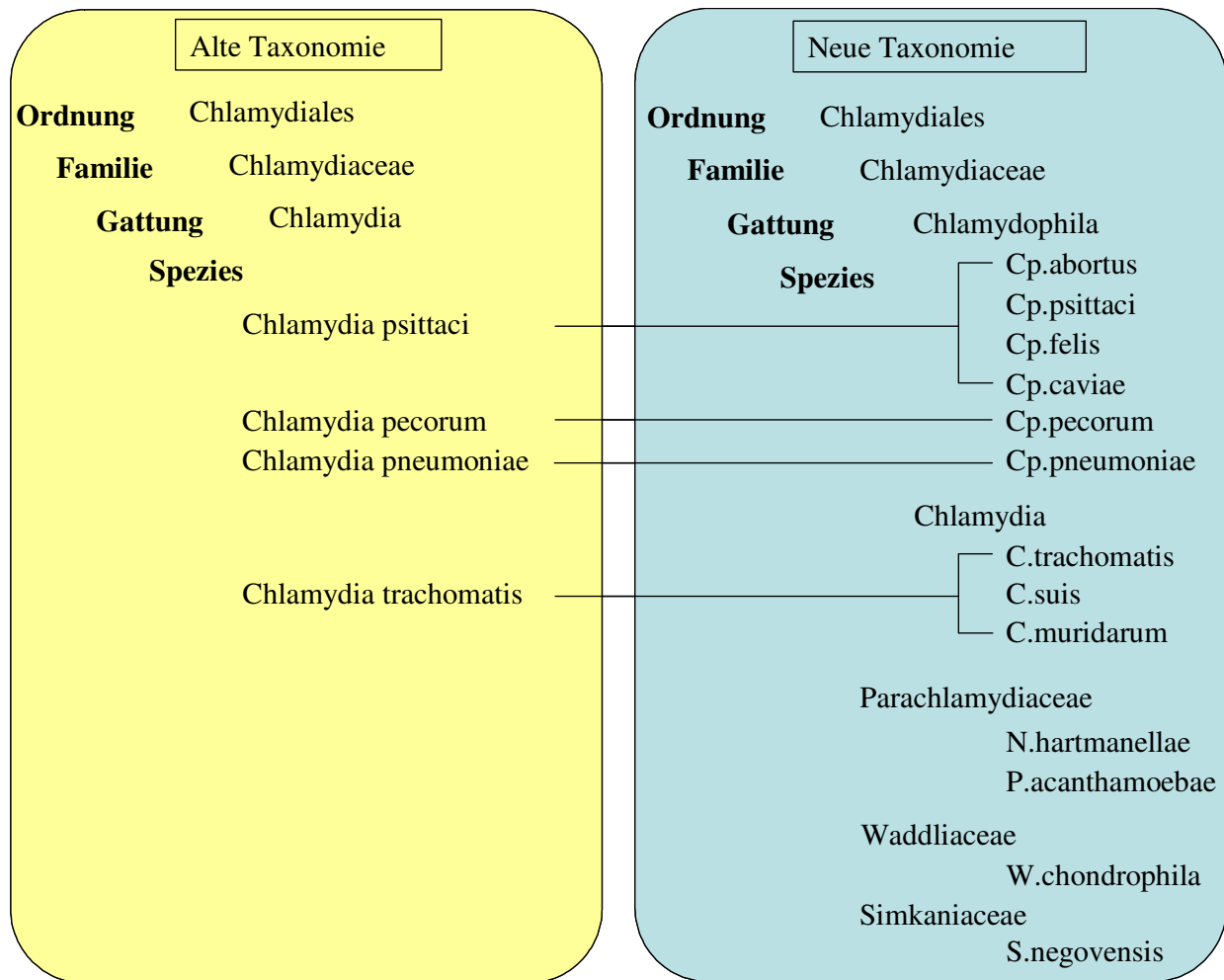


Abb. 1 Gegenüberstellung der alten und neuen Taxonomie (modifiziert nach BUSH u. EVERETT 2001); Cp.=Chlamydophila, C.=Chlamydia, N.=Neochlamydia, P.=Parachlamydia, W.=Waddlia, S.=Simkania

Zum Genus *Chlamydia* zählen heute die Spezies *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia suis* und *Chlamydia trachomatis*.

- *Chlamydia muridarum* wurde aus Mäusen und Hamstern isoliert. Es existieren bisher zwei bekannte Stämme (MoPn und SFPD). Die Infektion mit MoPn kann bei Mäusen Pneumonie verursachen oder asymptomatisch verlaufen. SFPD ist ein Isolat des Darms und konnte bisher noch nicht zusammen mit Krankheitssymptomen nachgewiesen werden (FOX et al. 1994).
- *Chlamydia suis* konnte mit wenigen Ausnahmen (TEANKUM et al. 2007) bisher nur beim Schwein isoliert werden. *Chlamydia suis* verursacht bei dieser Tierart Konjunktivitis, Enteritis, Pneumonie und häufig asymptomatische Infektionen. Untersuchungen, die auf der Analyse der DNA der *ompA*-Region (d.h. des

Genabschnittes, der das MOMP (major outer membrane protein) kodiert) basieren, wiesen nach, dass zwischen den Stämmen große Unterschiede bestehen. Einige Stämme sind gegenüber Sulfadiazin und/oder Tetracyclin resistent (LENART et al. 2001).

- *Chlamydia trachomatis* konnte bisher nur aus humanem Gewebe isoliert werden und umfasst die Biovare „Trachoma“ mit 14 Serovaren und „Lymphogranuloma venerum“ mit 4 Serovaren. Die Serovare des Biovars Trachoma infizieren hauptsächlich Epithelzellen von mukösen Membranen, während die Serovare des „Lymphogranuloma venerum“ vor allem in lymphatischem Gewebe zu finden sind.

Zum Genus *Chlamydophila* zählen die Spezies *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila caviae*, *Chlamydophila felis*, *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila pneumoniae* und *Chlamydophila psittaci*.

- *Chlamydophila abortus* wurde bisher als *Chlamydia psittaci* Serovar 1 bezeichnet und konnte aus Materialien von Schaf, Ziege und Rind isoliert werden. Er gilt als Aborterreger bei genannten Tierarten. Beim kleinen Wiederkäuer verursacht er den enzootischen Abort. Infektionen wurden mit Lebensschwäche von Neugeborenen bei Wiederkäuern, Pferden, Schweinen und Nagern assoziiert. Infizieren sich schwangere Frauen, sind Aborte möglich (POSPISCHIL et al. 2002a). Es besteht Zoonosegefahr.
- Wirt für *Chlamydophila caviae* (ehemals *Chlamydia psittaci* zugeordnet) ist das Meerschweinchen, bei dem nach einer Infektion Konjunktivitis mit eitrigem Augenausfluss auftreten kann. *Chlamydophila caviae* infiziert vor allem das Schleimhautepithel und ist nicht invasiv.
- Auch *Chlamydophila felis* wurde vordem als Stamm von *Chlamydia psittaci* geführt. Diese Spezies konnte aus dem Rachen und dem Genitaltrakt von Hauskatzen angezüchtet werden. Die Infektion ruft Entzündungen der Konjunktiven, der Nasennebenhöhlen sowie Erkrankungen des Respirationstraktes hervor. Infektionen des Menschen mit *Chlamydophila felis* wurden beschrieben (HARTLEY et al. 2001). Bisher sind drei Stämme bekannt.
- Die ehemals als *Chlamydia pecorum* bezeichnete Spezies wurde in *Chlamydophila pecorum* umbenannt und konnte bei Wiederkäuern, Koalas sowie Schweinen isoliert werden. Eine Infektion mit dem Erreger führt bei Koalas zu Reproduktionsstörungen, Infertilität und Erkrankungen des harnleitenden Systems. Bei anderen Tierarten, vor

allem den Wiederkäuern wird *Chlamydophila pecorum* mit Aborten, Konjunktivitis, Encephalomyelitis, Enteritis, Pneumonie und Polyarthritis assoziiert.

- *Chlamydophila pneumoniae* wurde früher als *Chlamydia pneumoniae* bezeichnet und umfasst drei Biovare. Diese Spezies soll für respiratorische Erkrankungen beim Menschen verantwortlich sein und wird als ein ätiologisches Agens für die Atherosklerose angesehen. *Chlamydophila pneumoniae* wurde in humanem und equinem Gewebe bzw. in Koalas und Amphibien nachgewiesen.
- *Chlamydophila psittaci* hieß früher *Chlamydia psittaci*. Wirte für *Chlamydophila psittaci* sind Vögel, Wiederkäuer und Pferde. Die Erkrankung tritt systemisch bei Vögeln auf. Diese verlaufen inapparent, häufig auch schwer und treten akut oder chronisch auf. Alle Stämme der 8 bekannten Serovaren sind leicht auf den Menschen übertragbar (EVERETT 2000).

Detaillierte Angaben zu speziellen Krankheitsbildern bei unterschiedlichen Spezies ist dem Kapitel 2.3.9 zu entnehmen.

2.3.2 Historischer Überblick

Chlamydien wurden erstmals in Konjunktivalabstrichen von Trachommateriale vom Menschen nachgewiesen. Wurde derartiges Material in die Augen von Orang-Utans eingebracht, anschließend konjunktivale Epithelzellen gewonnen und nach Giemsa gefärbt, waren intrazytoplasmatische Vakuolen zu beobachten, die kleinere Partikel (Elementarkörperchen) und größere Partikel (Retikularkörperchen) beinhalten (HALBERSTAEDTER u. VON PROWAZEK 1907). Aufgrund der blau gefärbten Matrix, in die die Partikel eingebettet waren, wurde der neu entdeckte Erreger als Protozoe angesehen und ihr der Namen Chlamydozoa gegeben (COLLIER 1990).

In den Jahren 1929-30 traten weit verbreitete Ausbrüche von atypischen und schweren Pneumonien aus. Da sie von Psittaziden ausgingen, wurden sie als Psittakose bezeichnet. Daraufhin beschrieben LEVINTHAL (1930), COLES (1930) und LILLIE (1930) unabhängig voneinander winzige basophile Partikel (Levinthal-Coles-Lilliesche Körperchen), die sie in Blutaussstrichen und in Gewebe infizierter Vögel und Menschen nach Giemsa-Färbung fanden. Chlamydien wurden früher häufig als große Viren betrachtet (PAGE u. GRIMES 1978), da sie einen intrazellulären Entwicklungszyklus aufweisen.

Unpassend war auch die Bezeichnung „Bedsonia“, nachdem Bedson den Erreger als „obligat intrazellularen Parasit mit bakteriellen Affinitäten“ beschrieb (FRITZSCH 1966). Es folgten andere Nomenklaturen: „Miyagawanella“ und „Halprowia“. Im Jahr 1945 wurde das Bakterium erstmals als „Chlamydia“ bezeichnet. Durch Einführung der Zellkulturtechnik und des Elektronenmikroskopes konnte das Gebilde schließlich als Bakterium identifiziert werden. Es wies DNA, rRNA und Ribosomen auf, war gegenüber Antibiotika empfindlich und vermehrte sich durch Querteilung (BISPING u. AMTSBERG 1988). Seine Zellwand glich der von Bakterien.

Die Berechtigung zur Bezeichnung „Chlamydien“ festigte sich vor allem durch die Arbeit von PAGE (1966).

Nach „Chlamydia“ folgte „Rickettsia“, dann wieder „Chlamydia“. Bis in die 90er Jahre bestand die Ordnung Chlamydiales nur aus einer Familie, der eine Gattung zugeordnet wurde. Erst später, mit Einführung molekularbiologischer Methoden, konnten neue Stämme beschrieben werden. Der Stammbaum wurde erweitert und schließlich eine neue Taxonomie vorgeschlagen (EVERETT et al. 1999).

2.3.3 Entwicklungszyklus

Chlamydien sind aerobe bis fakultativ anaerobe, gramnegative, kokkoide, obligat intrazellulär lebende Bakterien, die als „Energieparasiten“ bezeichnet werden. Sie sind selbst nicht zur Synthese von ATP und anderen Nukleotiden befähigt und müssen diese Substanzen parasitieren (McCLARTY 1999).

Chlamydien weisen einen einzigartigen Entwicklungszyklus auf. Sie existieren als extrazellulär vorkommende Elementarkörperchen (elementary body = EB) und intrazelluläre Initial- bzw. Retikularkörperchen (reticulate body = RB). Die EB sind elektronendicht, nicht vermehrungsfähig und infektiös. Sie weisen einen Durchmesser von 0,2-0,6 µm auf. Die RB besitzen einen Durchmesser von 0,5-1,0 µm, sind vermehrungsfähig, nicht infektiös und metabolisch aktiv. Den EB fehlt eine Stoffwechselaktivität. Sie sind metabolisch nur minimal aktiv (Ruhephase) und besitzen eine hohe Resistenz gegenüber Austrocknung, sind jedoch nur schwach widerstandsfähig gegen Fäulnis und Sonnenlicht (SELBITZ 1992). EB sind unempfindlich gegenüber Antibiotika.

Durch EB wird eine Infektion initiiert. Nach Kolonisierung des Zielorgans heften sie sich an die empfängliche Wirtszelle an (McCLARTY 1994). Derzeit besteht Unklarheit, wie die EB in die Zelle gelangen. Mögliche Mechanismen sind rezeptorvermittelte Endozytose bzw.

Pinozytose, oder über Phagozytose, die für Parasiten nicht ungewöhnlich ist (SCHACHTER 1988, WYRICK u. RICHMOND 1989, BAVOIL et al. 2000). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Chlamydien mehrere Mechanismen benutzen, um in die Wirtszelle zu gelangen (SCHACHTER 1988).

Ist die Zelle infiziert (d.h. EBs eingedrungen), entwickeln sich die Chlamydien in intrazellulären Vakuolen weiter, diese Vakuolen werden als Einschlüsse bzw. Inklusionen bezeichnet. Die Oberflächenantigene vitaler Chlamydien verhindern eine Verschmelzung der Vakuole mit den Lysosomen zu Phagolysosomen (Abb. 2; SCHACHTER 1988, MÅRDH 1989, WYRICK u. RICHMOND 1989, BAVOIL et al. 2000). Chlamydien besitzen zahlreiche Mechanismen, um die Abwehr des Wirtsorganismus zu umgehen.

Nach der Aufnahme der Chlamydien in die Zelle werden die EB innerhalb von sechs bis zehn Stunden in RB transformiert (Abb. 2; McCLARTY 1994). Die Struktur der RB ist „aufgelockerter“ (dispersing form) als die der EB. Dadurch ist es ihnen möglich ATP und notwendige Nährstoffe aufzunehmen. Innerhalb der Vakuole beginnen sich die RB durch Zweiteilung mit einer Verdopplungszeit von zwei Stunden zu vermehren; nur in diesem Stadium ist eine Antibiose erfolgreich. Die binäre Teilung der RB ist charakterisiert durch die Umwandlung zunächst ovaler RB in RB mit einer typischen „Sanduhren-Form“ (ANDERSEN u. VANROMPAY 2003). Der Replikationszyklus der Chlamydien ist asynchron, d.h. dass in der gleichen Vakuole während der meisten Teilungszyklen EB, RB und Übergangsformen zeitgleich gefunden werden (McCLARTY 1994).

Nach 48-72 Stunden bestehen die Einschlüsse aus bis zu 1000 EB (SCHACHTER 1988). Die Elementarkörperchen werden anschließend durch die Ruptur der Wirtszelle oder dem Verschmelzen der Inklusion mit der Plasmamembran der Wirtszelle freigesetzt (EVERETT 2000). Im Fall von persistenten Infektionen findet in der Wirtszelle durch den Einfluss von Zytokinen, wie Interferon Gamma, keine Redifferenzierung der RB in EB statt. Die Einschlüsse nehmen eine aberrante Form an, die neugebildeten Chlamydien werden nicht freigesetzt und die Wirtszelle geht nicht zugrunde (BEATTY et al. 1994).

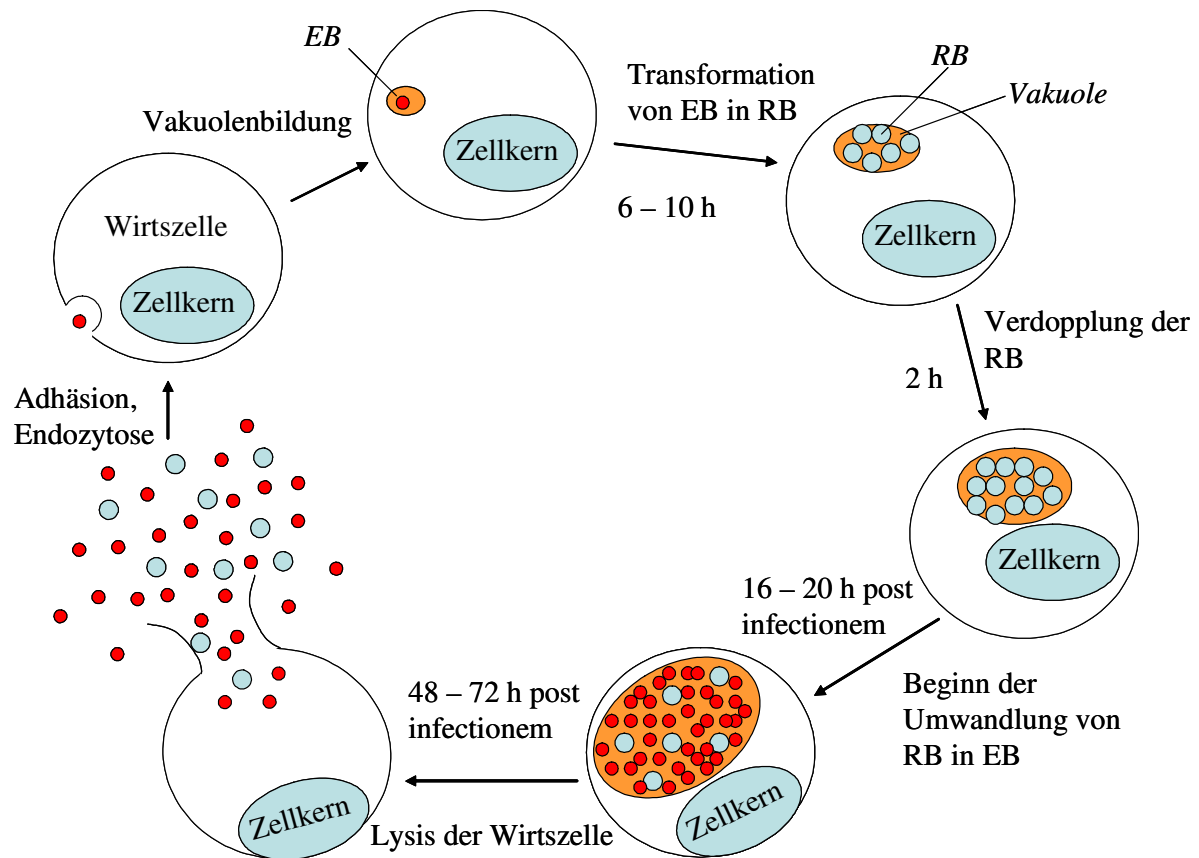


Abb. 2 Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus der Chlamydien (modifiziert nach EVERETT 2000). EB = elementary body (Elementarkörperchen), RB = reticulate body (Retikularkörperchen)

2.3.4 Morphologie

Die Chlamydienwand ist aus einem muraminhaltigem Mukopeptid und einem Lipopolysaccharidkomplex (LPS) aufgebaut (WILDFÜHR u. WILDFÜHR 1979). Der Aufbau der Zellwand gleicht dem gramnegativer Bakterien. Nur Peptidoglykan fehlt (SACHSE u. GROSSMANN 2002).

EB und RB besitzen eine innere und äußere Membran mit einem periplasmatischen Raum (Abb. 3; EVERETT 2000). Die RB bestehen im Inneren aus feinen netzartigen Strukturen mit zahlreichen Ribosomen (STORZ u. KALTENBOECK 1993). Die EB besitzen einen zentralen, elektronendichten Kern aus Desoxyribonukleinsäure (DNA), der von einer dreischichtigen zytoplasmatischen (inneren) Membran und einer dreischichtigen äußeren Membran umgeben ist. Diese trilaminare äußere Membran besteht aus einem Netz von hexagonalen Untereinheiten. Eine hexagonale Einheit setzt sich aus sechs Dimeren des MOMP zusammen, die um eine zentrale Vertiefung angeordnet sind (CHANG et al. 1982).

Die MOMP sind zysteinreiche, 40 kDa große Proteine (EVERETT u. HATCH 1995), die über Disulfidbrücken untereinander und mit weiteren Proteinen verbunden sind (SCHACHTER 1988, HATCH 1996). Die Disulfidbrücken verleihen den EB die notwendige extrazelluläre osmotische Stabilität (SACHSE u. GROSSMANN 2002). Die MOMP stellen mit 60% den Hauptbestandteil der äußeren Membran dar. Während Peptidoglykane bei anderen Bakterien die strukturelle Integrität des jeweiligen Organismus gewährleisten, übernimmt MOMP diese Funktion bei den Chlamydien. Der zweite wichtige Bestandteil der Außenmembran ist das Lipopolysaccharid (LPS). Bei RB wirken LPS möglicherweise als Poren, durch die hydrophile Komponenten entlang eines Konzentrationsgradienten passiv diffundieren können (McCLARTY 1994). Im Periplasma lokalisierte Strukturproteine geben der Chlamydienwand ihre Form und Festigkeit bzw. Elastizität.

Die Oberfläche der EB weist ferner kleine hemisphärische sowie spikeähnliche Projektionen auf, deren Funktionen noch unbekannt sind. Denkbar ist, dass sie für die Anheftung an die Wirtszelle oder den Nährstofftransport verantwortlich sind (SCHACHTER 1988).

Das Genom der Chlamydien ist mit $1,0 \times 10^6$ Basenpaaren vergleichsweise deshalb so klein, da Chlamydien eine geringe biosynthetische Kapazität, insbesondere ihre Unfähigkeit ATP (Adenosintriphosphat) selbst zu synthetisieren, aufweisen (McCLARTY 1994). Funktionsfähige RB enthalten Mitochondrien zur ATP-Aufnahme und ADP-Abgabe (SCHACHTER 1988, McCLARTY 1994).

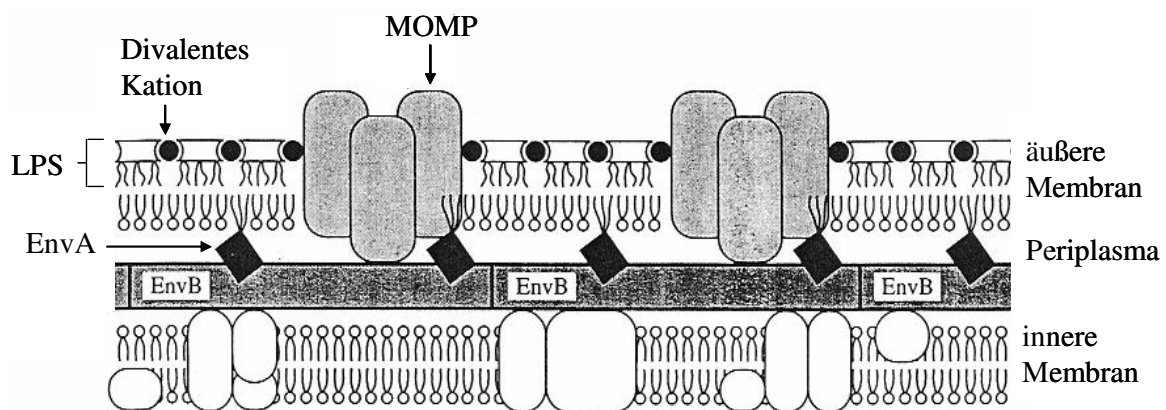


Abb. 3 Schematische Darstellung des Wandaufbaus eines Elementarkörperchens von *Chlamydia psittaci* 6BC (nach EVERETT u. HATCH 1995). In der äußeren Membran ist das MOMP als großes transmembranales Protein lokalisiert. LPS = Lipopolysaccharid, Env A, B = Envelope A,B (Strukturproteine)

2.3.5 Antigene Eigenschaften

Chlamydien besitzen genus-, spezie- und serovarspezifische Antigene. Als gemeinsames hitzestabiles Gruppenantigen besitzen die Chlamydien ein Lipopolysaccharid. Es kommt sowohl in Elementarkörperchen als auch in Retikularkörperchen vor, ist in der äußeren Zellwand lokalisiert und kann mittels Komplementbindungsreaktion (KBR) nachgewiesen werden. Das LPS-Molekül weist genusspezifische Epitope auf (BARWELL 1952). Diese Epitope sind bei RB auf deren Außenmembran lokalisiert, während sie sich bei Elementarkörperchen eventuell in der Innenmembran befinden (STEPHENS et al. 1982). Das MOMP hat gleichfalls antigenetische Eigenschaften, ist darin jedoch sehr heterogen. Es weist speziesspezifische Domänen und subspezies- sowie serotypspezifische Antigene auf (CALDWELL u. SCHACHTER 1982).

2.3.6 Diagnostische Verfahren

2.3.6.1 Histochemischer Erregernachweis

In Abstrich- oder Abklatschpräparaten von Gewebematerial oder -kulturen können sowohl Elementarkörperchen wie auch zytoplasmatische Einschlüsse mittels verschiedener Färbemethoden (Gimenez, Macchiavello, Stamp, Castaneda oder Giemsa) identifiziert werden (SCHACHTER 1991, SELBITZ 1992). Eine wesentliche Voraussetzung für den erfolgreichen Antigennachweis ist zellreiches Probenmaterial. Die Färbung erlaubt keine Unterscheidung zwischen den Spezies. Der Nachweis eignet sich nur bei Proben mit relativ hohem Antigengehalt. Vorteil dieses Verfahrens ist der geringe Zeitaufwand.

2.3.6.2 Nachweis durch den Tierversuch

Beim Nachweis von Chlamydien im Tierversuch wurden Mäuse oder Meerschweinchen eingesetzt (BISPING u. AMTSBERG 1988, ZANA et al. 1990).

Die chlamydienhaltigen Gewebe- oder Kotsuspensionen wurden dabei intraperitoneal, seltener intranasal oder intracerebral verabreicht (GRIMES u. WYRICK 1991). Nach Tötung der Tiere ca. sieben Tage *post infectionem* wurden Abklatschpräparate des Peritoneums angefertigt und mikroskopisch auf EB untersucht. Untersuchungsergebnisse lagen frühestens nach ein bis zwei Wochen vor, so dass der Tierversuch neben der ethischen Unvertretbarkeit auch aus Zeitgründen keine Etablierung fand.

2.3.6.3 Erreger-Anzüchtungen

Die Standardmethode zum Nachweis von Chlamydien ist deren Anzucht in der Zellkultur oder im bebrüteten Hühnerei (Goldstandard).

-Zellkultur

Geeignete Zelllinien für den Nachweis von Chlamydien sind BGM (Buffalo green monkey, Nierenzelllinie), HeLa (humane Zervixkarzinom-Zelllinie) oder McCoy (zellfreies Nährmedium). Probenmaterial wird auf die Zelllinie gebracht, bei 37°C in Deckglaskulturen bebrütet und in regelmäßigen Abständen (z.B. am dritten und sechsten Tag) nach Fixation und geeigneter Färbung auf Chlamydien untersucht (BISPING u. AMTSBERG 1988, SACHSE u. HOTZEL 2000). Farblich markiert heben sich die intrazytoplasmatische Einschlüsse der Chlamydien von anders koloriertem Zelluntergrund ab (BISPING u. AMTSBERG 1988). Auch der direkte Immunfluoreszenztest eignet sich zum Nachweis angezüchteter Chlamydien (SACHSE u. HOTZEL 2000). Weiterer Vorteil der Zellkultur ist der Nachweis der Lebensfähigkeit der Chlamydien. Angezüchtete Chlamydien können serotypisiert und auf Resistenzen überprüft werden. Rückschlüsse auf die Pathogenität des Erregers sind jedoch nicht möglich. Die Anzüchtung der Chlamydien im Zellkultursystem ist hoch spezifisch. Als Nachteil gelten hoher Zeit- und Arbeitsaufwand. Befunde liegen frühestens nach 48-72 Stunden, unter Umständen aber auch erst nach 2-6 Wochen vor (SACHSE u. HOTZEL 2000). Die Sensitivität (als Parameter für die Empfindlichkeit eines Systems oder Verfahrens) der Zellkulturen ist abhängig von der Chlamydienspezies und dem Untersuchungsmaterial sehr unterschiedlich. So lassen sich aviäre, ovine und humane Spezies ohne weiteres vermehren, wohingegen sich bestimmte Stämme aus Rind und Schwein als schwer kultivierbar erweisen (SACHSE u. GROSSMANN 2002).

-bebrütetes Hühnerei

Der Nachweis im bebrüteten Hühnerei erfolgt wie nachfolgend beschrieben: Unter Zusatz von Antibiotika wird aus dem Untersuchungsmaterial eine homogene Suspension hergestellt und in den Dottersack des Hühnereis injiziert. Die Eier werden bei 37°C bebrütet. Nach 5-10 Tagen sterben die meisten Embryonen ab. Vermehren sich die Chlamydien, können diese in der Chorion-Allantois-Membran mit Hilfe der Färbung nach Gimenez mikroskopisch nachgewiesen werden (BISPING u. AMTSBERG 1988). Ein Nachteil der Hühnereimethode

ist deren Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Kontaminationen. Bakterien vermehren sich im embryonierten Hühnerei explosionsartig. Sie verursachen das frühzeitige Absterben des Embryos (LEONHARD 1987). Das Verfahren ist sehr zeit- und arbeitsaufwendig. Häufig sind mehrere Dottersackblindpassagen notwendig, bevor Resultate erreicht werden (KÖLBL 1969).

2.3.6.4 Methoden, die auf dem Nachweis von Antigen basieren

-Immunfluoreszenztest

Bei der direkten Immunfluoreszenztechnik bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex. Zu Probenmaterial (mit Antigen) wird ein Antikörper zugegeben, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wurde.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden zwei Antikörper verwendet. Der erste ist nicht markiert. Er bindet an das Antigen. Der zweite ist markiert und bindet an den ersten Antikörper. Dieses Verfahren gilt als sensitiver als die direkte Methode. Als Farbstoff wird z.B. Fluoreszin-Isothiozyanat verwendet, das nach Anregung durch ultraviolette Strahlung hell gelbgrün aufleuchtet. Nachteil beider Immunfluoreszenzverfahren ist die geringe Haltbarkeit markierter Präparate und hohe apparative Voraussetzungen (Fluoreszenzmikroskop). Aufgrund unspezifischer Fluoreszenzen können diagnostische Schwierigkeiten auftreten. Kreuzreaktionen polyklonaler Seren mit anderen Bakterien und Pilzen sind möglich. Werden monoklonale Antikörpern verwendet, besteht die Gefahr speziesübergreifender Reaktionen (SACHSE u. HOTZEL 2000). Vorteil beider Immunfluoreszenzverfahren ist der geringe Zeit- und Arbeitsaufwand. Ergebnisse sind noch am Tag der Untersuchung zu erwarten.

-Antigen-ELISA (kompetitiver oder direkter ELISA)

Der Antigen-ELISA beruht auf dem Nachweis des Lipopolysaccharid (LPS)-Antigens. Er dient dem Nachweis der Gattung *Chlamydia* (GERBERMANN 1997). Kreuzreaktionen sind möglich, da LPS-Antigene auch bei anderen gramnegativen Bakterien vorkommen (SACHSE u. HOTZEL 2000). Die Sensitivität ist im Vergleich zu anderen Verfahren, wie Zellkultur oder Immunfluoreszenz geringer (BOGNER et al.1997).

2.3.6.5 Methoden, die auf dem Nachweis von Antikörpern basieren

-KBR (Komplementbindungsreaktion)

Die KBR basiert darauf, dass der Verbrauch von Komplementfaktoren (System von Plasmaproteinen) nachgewiesen wird (SACHSE u. HOTZEL 2000). Sind Antikörper in der Probe, findet eine Immunreaktion statt, bei der erst Antikörper (der Probe) mit zugeführtem Antigen Antigen-Antikörper-Komplexe bilden, an die dann Komplement bindet. Wird viel Komplement gebunden steht wenig Komplement zur Bindung an Schaferythrozyten mit Hämolysin zur Verfügung, die intakt bleiben und nicht hämolysieren. Anders bei geringem Verbrauch von Komplement; in diesem Fall hämolysieren viele Erythrozyten. Es folgt eine Farbreaktion, die sichtbar ist und zu einem negativen Befund führen wird. Der Nachweis eines 4fach erhöhten KBR-Titers ist für einen positiven diagnostischen Befund notwendig (SACHSE u. HOTZEL 2000).

-Antikörper-ELISA (nichtkompetitiver oder indirekter ELISA)-

In kommerziell erhältlichen Antikörper-ELISA-Kits wird das LPS-Antigen von gereinigten Elementar- und Retikularkörperchen verwendet, um gattungsspezifische Antikörper gegen Chlamydien nachzuweisen. Es muss mit Kreuzreaktionen gerechnet werden (WITTENBRINK 1991b). Der indirekte ELISA ist leicht durchführbar, gewährleistet einen hohen Probendurchsatz und ist relativ sensitiv (SACHSE u. GROSSMANN 2002). Neuere Tests erlauben den speziesspezifischen Antikörpernachweis. Dabei werden gereinigte Proteine der äußeren Chlamydienmembran oder rekombinante Proteine als Antigene eingesetzt (FAIRLEY et al. 2000). Für die erfolgreiche Anwendung des indirekten ELISA sind ausreichende Antikörpertiter Voraussetzung. Der Test versagt gelegentlich bei chronisch bzw. subakut erkrankten Tieren, deren Antikörpertiter zu niedrig sind (SACHSE u. HOTZEL 2000). Die Interpretation der Befunde (als relevant oder nicht) ist nicht immer einfach, da häufig hohe „Untergrundtiter“ als Folge des hohen allgemeinen Durchseuchungsgrades in der jeweiligen Population auftreten (SACHSE u. HOTZEL 2000).

-Mikroimmunfluoreszenztest

Unter Verwendung dieser Technik können speziesspezifische Antikörper nachgewiesen werden. Über Ei- oder Zellkulturen gewonnene gereinigte EB werden als Antigen eingesetzt

(MÅRDH 1989). Für den Einsatz in der Routinediagnostik ist der Test zu aufwendig und ist gegenwärtig nur in wenigen Laboratorien verfügbar (ANON. 2001).

2.3.6.6 Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken (NAT)

Die Polymerase-Chain-Reaction (PCR), Restrictionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-PCR und Real-Time-PCR sind die derzeit gebräuchlichsten molekularbiologischen Techniken zur Detektion von Chlamydien. Mit Hilfe der PCR werden spezifische DNA Bestandteile nachgewiesen.

Die von KALTENBOECK et al. (1997) entwickelte PCR zum Nachweis von Chlamydien basiert auf einer dreistufigen PCR (Abb. 4). Dabei werden Abschnitte des *omp1* Gens (auch *ompA*), das für das MOMP kodiert, amplifiziert (KALTENBOECK et al. 1993). Diese PCR erlaubt die Unterscheidung der Chlamydien entsprechend alter Nomenklatur, d.h. die Erkennung von *C. psittaci*, *C. trachomatis*, *C. pecorum* und *C. pneumoniae*. Grund dafür ist, dass sich innerhalb des amplifizierten *omp1*-Fragments vier Domänen (VD I-IV) befinden, die variabel und speziesspezifisch sind. In der dreistufigen PCR wird im ersten und zweiten Schritt eine genussspezifische PCR durchgeführt, bei der die Primer an Zielsequenzen von konservierten Regionen des *omp1* binden. Neben der ersten wird eine zweite genussspezifische Amplifikation („nested PCR“) von KALTENBOECK et al. (1997) empfohlen, da es dadurch zu einer Verbesserung der Sensitivität kommt. Im dritten Schritt werden speziesspezifische Primer eingesetzt, die komplementär zu spezifischen Abschnitten („DNA signature regions“) der jeweiligen Chlamydienspezies sind. Bei *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia pneumoniae* liegen diese zwischen VD III und IV und bei *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pecorum* zwischen VD II und III.

Vorteil der *omp1*-PCR nach KALTENBOECK et al. (1997) ist dessen hohe Sensitivität, da eine Einschlussbildende Einheit (EBE) nachgewiesen werden kann (SACHSE u. GROSSMANN 2002). Durch den Einsatz von Allel-spezifischen Primern in der dritten PCR (KALTENBOECK et al. 1997) kann zum Teil nach neuer Taxonomie differenziert werden. Diese PCR gilt allerdings als sehr anfällig gegenüber Kontaminationen (SACHSE u. HOTZEL 2000).

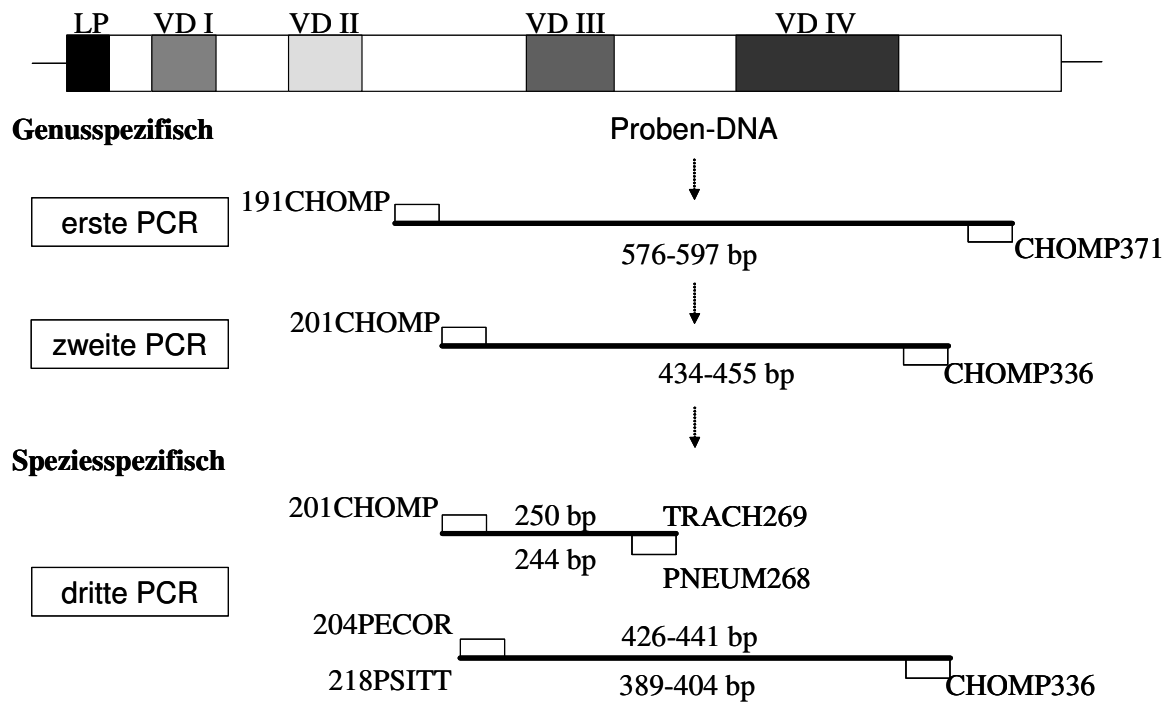


Abb. 4 Schematische Darstellung der dreistufigen PCR nach KALTENBÖCK et al. (1997), modifiziert nach SACHSE u. HOTZEL 2000. Der obere Balken symbolisiert das *omp1* Gen, von dem Abschnitte amplifiziert werden. LP: Leaderpeptid, VD I bis IV: variable Domänen. Erste und zweite PCR dienen dem Nachweis des Genus. In der dritten PCR wird die Spezies nachgewiesen. Die zu erwartenden Längen der genus- bzw. speziesspezifischen Amplikons sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

Mit Hilfe der RFLP-PCR nach EVERETT u. ANDERSEN (1999) wird eine Differenzierung der Chlamydienpezies gemäß der neuen Taxonomie möglich. Dabei wird eine 600 bp Sequenz in der Spacerregion zwischen den 16S- und 23S-rRNA-Genen in einer einstufigen PCR amplifiziert und anschließend durch Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) charakterisiert. Diese PCR ist wesentlich weniger sensitiv als die PCR nach Kaltenboeck et al. (1997), da nur eine einstufige PCR erfolgt (SACHSE u. GROSSMANN 2002) und durch den Restriktionsverdau ein weiterer Sensitivitätsverlust auftritt.

Mithilfe der Real-Time-PCR können die im Probenmaterial enthaltenen Chlamydien quantifiziert werden (EVERETT et al. 1999b). Als Referenz dient eine Verdünnungsreihe, die einen definierten Gehalt an EBE aufweist. Der PCR-Ansatz enthält neben spezifischen Primern auch eine sequenzspezifische Hybridisierungs-sonde, die am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff, am 5'-Ende aber mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff markiert ist. Wenn die intakte Sonde durch Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird, so

wird die Fluoreszenz-Emission des Reporterfarbstoffs durch die räumliche Nähe zu dem Quencherfarbstoff unterdrückt. Nach Amplifikation der Proben werden die Fluoreszenzsignale der Probenamplifikate mit denen der mitgeführten Standards verglichen. Aus den dabei entstandenen Messreihen kann eine Kalibrationskurve berechnet werden. Die Anzahl der EBE in der Probe können aus dieser Kurve ermittelt werden. Dieses Verfahren ist sehr sensitiv und spezifisch. Wie auch die PCR ist die Real-Time-PCR anfällig gegenüber Kontaminationen (SACHSE u. GROSSMANN 2002).

2.3.6.7 Weitere Nachweismethoden

Weitere Nachweismethoden sind die konfokale Laserscanning-Mikroskopie, und die Elektronenmikroskopie (ROCKEY et al. 1996) sowie immunhistologische Verfahren, die auf dem Nachweis von Chlamydien in histologischen Präparaten mit Hilfe unterschiedlich markierter Antikörper (Peroxidase-Antiperoxidase; Avidin-Biotin-Komplex) basieren (MÄRDH 1989, STRAUMANN KUNZ et al. 1991). Diese sind vor allem wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten und in der Routinediagnostik weniger etabliert.

2.3.7 Chlamydiale Infektionen des Genitaltraktes

2.3.7.1 Beim Menschen

Chlamydien-assoziierte, nicht-genitale Erkrankungen des Menschen sind unter anderem: Trachom, Atemwegserkrankungen, Neugeborenenkonjunktivitis, Artherosklerose (KAKLIKKAYA et. al. 2006), Asthma (ALLEGRA et al. 1994), multiple Sklerose (SRIRAM et al. 2005). Genitale Infektionen werden vor allem durch *Chlamydia trachomatis* verursacht. Dieser Spezies gehören 14 Serovare an (Tab. 1). Es sind allerdings nur einzelne Serovare (D-K), die genitale Komplikationen verursachen.

Tab. 1 Erkrankungen beim Menschen, die durch *Chlamydia trachomatis* hervorgerufen werden (modifiziert, in Anlehnung an PEELING u. BRUNHAM 1996)

Serovar	Erkrankung beim Menschen
A-C	Trachom
D-K	Einschlusskonjunktivitis (Erwachsene und Neugeborene, non-gonorrhoische Urethritis, Epididymitis, mukopurulente Zervizitis, Urethralesyndrom der Frau, Endometritis, Salpingitis, Perihepatitis, Neugeborenenpneumonie, reaktive Arthritis)
L ₁ -L ₃	Lymphogranuloma venerum

Chlamydia trachomatis Infektionen zählen zu den am häufigsten sexuell übertragbaren bakteriellen Infektionen. Annähernd 50 % tubaler Sterilitäten (MOORE u. CATES 1990) und 25 % der extrauterinen Graviditäten (WOLNER-HANSEN et al. 1990) werden durch *Chlamydia trachomatis* hervorgerufen. Frauen mit einem Alter zwischen 15 und 25 Jahren sind am häufigsten betroffen. Ursachen sind vielfältig, morphologische Besonderheiten der jugendlichen Zervix (physiologisch größere Ektopie) und intensiveres Sexualverhalten nur beispielhaft genannt (PETERSEN u. CLAD 1995). Die Übertragung erfolgt sexuell. Beide Partner können sich wechselseitig anstecken. Erstes Anzeichen einer Frau kann eine mukopurulente Zervizitis sein, die in der Regel asymptomatisch verläuft. Gelegentlich sind gelblich-klebriger Ausfluss und Kontaktblutungen zu beobachten. Bei der Hälfte aller mit *Chlamydia trachomatis* infizierten Frauen liegt zeitgleich eine Entzündung der Urethra vor (PAAVONEN u. EGGERT-KRUSE 1999). Bleibt die Infektion unerkannt oder wird aus anderen Gründen nicht therapiert, ascendieren die Chlamydien über den Uterus in die Eileiter. Wird die Infektion klinisch, liegt häufig das Syndrom der „Pelvic Inflammatory Disease“ (PID) vor, das verschiedenste Erkrankungen bzw. Manifestationen beinhaltet, die alleinig oder zeitgleich auftreten. Genannt seien: Endometritis, Salpingitis, Beckenperitonitis, Periappendizitis und Perihepatitis (PAAVONEN u. EGGERT-KRUSE 1999). Aszendierende Infektionen des Eileiters, wie sie auch bei Labortieren (RANK et al. 2000) und Primaten (VAN VOORHIS et al. 1997) experimentell auszulösen sind, überwiegend fatal, da sie aufgrund schwerwiegender Pathologie zu dauerhafter Sterilität führen. Tubale Infektionen sind häufig inapparent, in ihrer Konsequenz aber nicht weniger fatal als klinisch manifeste Entzündungen. Erschwerend kommt hinzu, dass derartige Infektionen nicht zu erkennen sind und deshalb nicht therapiert werden. Die Pathomorphologie ist vielfältig. Deziliationen und ziliäre Dysfunktionen wurden beschrieben und mit beeinträchtigtem Eizelltransport assoziiert

(LUCISANO et al.1992, ZENG et. al.1998). Degenerationen der sekretorischen Zellen (RASMUSSEN et al. 1997) stören vermutlich die Fertilisation und die frühe Embryonalentwicklung (BUHI et al. 1997). Bei der akuten Salpingitis sind gerötete, geschwollene oder eitrig bzw. fibrinös veränderte Eileiter typisch, die zudem gelegentlich Adhäsionen aufweisen (HOYME et al. 1988). Als Zeichen eines chronischen Prozesses können Plasmazellinfiltrationen und Obstruktionen des Tubenepithels beobachtet werden (LENG et al. 1998). Die Chlamydieninfektion bei der Frau geht jedoch nicht immer mit histopathologischen Veränderungen einher (SHEPARD u. JONES 1989, MOUNT et al. 2001). Ähnliches wurde auch bei Meerschweinchen (RANK et al. 2000) und Mäusen (TUFFREY et al. 1994) beobachtet.

Genitale Infektion des Mannes sind überwiegend asymptomatisch und der männliche Geschlechtspartner deshalb als Quelle der Infektion nicht zu unterschätzen. Infiziert sich der Mann, können Harnröhre, akzessorische Geschlechtsdrüsen und/oder Nebenhoden kolonialisiert werden. Bei homosexuellem Kontakt kann Proktitis auftreten.

Chlamydia trachomatis kann durch künstliche Besamung übertragen werden (NAGEL et al. 1986). Chlamydien überleben die Kryokonservierung (SHERMAN u. JORDAN 1985).

2.3.7.2 Beim Schwein

Chlamydien sind beim Schwein ubiquitär (SACHSE u. GROSSMANN 2002). Serologische Untersuchungen geben hohe Prävalenzdaten in Zuchtsauenherden (16,3 % HARIS 1976, 33 % EGGEMANN et al. 2000, 61,7 % CAMENISCH et al. 2004) wie in Eberstudien (36,9 % KAUFFOLD et al. 2006) wieder.

Infektionen werden mit einer Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen assoziiert. Konjunktivitis, Pneumonie, Polyserositis, Polyarthritis, Pericarditis, Infektionen des Intestinaltraktes und Mastitis wurden beschrieben (KIELSTEIN et al. 1983, STELLMACHER et al. 1983, WOOLLEN et al. 1990, WITTENBRINK et al. 1991, POSPISCHIL et al. 1998, ZIMMERMANN u. PLONAIT 2001). Nachfolgende Spezies wurden bisher beim Schwein beschrieben: *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydia suis* und „*Chlamydia-like*“-Organism.

Genitale Infektionen der Sauen sollen Ursache für Aborte (SHERBAN et al. 1972, 1978, SCHILLER et al. 1997, THOMA et al. 1997), Mumifikation von Feten (DANIELS et al. 1994), perinatale Mortalität (DANIELS et al. 1994), Endometritis (BUSCH et al. 2000), Vaginalausfluss (EGGEMANN et al. 2000) und wiederholtes Umrauschen (CAMENISCH et

al. 2004, WITTENBRINK 1991) sein. In Uteri und Zervixabstrichen reproduktionsgestörter Sauen wurden *Chlamydophila abortus* und *Chlamydia suis* (BUSCH et al. 2000, EGGEMANN et al. 2000, HOELZLE et al. 2000, CAMENISCH et al. 2004, HOTZEL et al. 2004) nachgewiesen und *Chlamydia psittaci* Servovar 1 (jetzt: *Chlamydophila abortus*) konnte aus Abortmaterial isoliert werden (SCHILLER et al. 1997, THOMA et al. 1997). Chlamydien wurden sporadisch im Eileiter von Sauen nachgewiesen (BUSCH et al. 2000, CAMENISCH et al. 2004). Wurden Jungsaugen mit einem humanpathogenen, genitalen Stamm von *Chlamydia trachomatis* vaginal infiziert, aszendierten die Chlamydien über den Uterus in die Eileiter. Beide Organe wiesen entzündliche Veränderungen auf (VANROMPAY et al. 2004).

Bei Ebern wurden Chlamydieninfektionen im Zusammenhang mit Orchitis, Epididymitis, Entzündungen der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und Urethritis beobachtet (SARMA et al. 1983, STELLMACHER et al. 1983, VEZNIK et al. 1996).

Wie sich Schweine genital infizieren, ist unklar. In Analogie zu anderen Spezies (Mensch: LUCISANO et al. 1992, Rind: DEGRAVES et al. 2003, DEGRAVES et al. 2004, JEE et al. 2004, Schaf: LONGBOTTOM u. COULTER 2003) ist zu vermuten, dass sexuelle und nicht-sexuelle Übertragungswege zur Infektion führen.

Ob die Chlamydiose der Schweine eine autarke selbstständige Erkrankung ist oder ein klinisches Bild nur dann entsteht, wenn zeitgleich begünstigende Faktoren auftreten (multifaktorielle Erkrankung), bleibt zu eruieren. Das Schwein als Wirt zahlreicher Chlamydienspezies inklusive solcher mit Zoonosepotenzial, sollte nicht unterschätzt werden. (SACHSE u. GROSSMANN 2002).

2.3.7.3 Beim Wiederkäuer

Chlamydieninfektionen der Wiederkäuer können sich in Form von Enteritiden, Pneumonien, Polyarthritiden, Keratokonjunktivitis, Infektionen des harnbildenden und harnableitenden Traktes, Mastitis und Enzephalitis manifestieren (HOPKINS et al. 1973, WEHR et al. 1985, ANDREWS et al. 1987, BISPING u. AMTSBERG 1988, PIERCY et al. 1999, JONES 1997, NIEMCZUK u. BEDNAREK 2002). Aus Organmaterial von Wiederkäuern konnten bisher *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila felis* und *Chlamydophila pecorum* isoliert werden (TYCZKA u. JÄGER 2002).

Chlamydophila abortus ist für Aborte bei Rindern (POSPISCHIL et al. 2002b) und kleinen Wiederkäuern (BOREL et al. 2002, CHANTON-GREUTMANN et al. 2002) verantwortlich.

Der Verlauf ist bei Schaf und Ziege enzootisch („Enzootischer Abort“) (POSPISCHIL et al. 2002a). Da *Chlamydophila abortus* auch bei der Frau Aborte provoziert und zoonotisch ist, sollten schwangere Frauen Schafe und Ziegen meiden (POSPISCHIL et al. 2002a). Die Infektion erfolgt möglicherweise venerisch, aber auch extragenital mit Chlamydien der Umgebung (DEGRAVES et al. 2003, DEGRAVES et al. 2004, JEE et al. 2004). Auch *Chlamydophila psittaci* soll genitale Infektionen verursachen (WITTENBRINK et al. 1993, WITTENBRINK et al. 1994). Ebenso wird *Chlamydophila pecorum* im Zusammenhang mit Fertilitätsstörungen beschrieben (KALTENBOECK et al. 2005). Der Nachweis von Chlamydien gelang im Eileiter. Über chlamydien-bedingte tubale Schäden liegen keine Angaben vor (LONGBOTTOM 2004).

2.3.7.4 Beim Pferd

Angaben zu Chlamydien bei Pferden sind spärlich. Chlamydien-assoziierte Augeninfektion wurde beschrieben (STORZ 1971). Ferner sollen durch Chlamydien verursacht werden: Polyarthritiden beim Fohlen (MC CHESNEY et al. 1974), Erkrankungen des Respirationstraktes (POPOVICI u. HIASTRU 1968, MOORTHY u. SPRADBROW 1978, MC CHESNEY et al. 1982), Hepatoencephalitis (BLANCO LOIZEILER 1968). Nicht immer treten Erkrankungen auf; klinisch gesunde Pferde waren wiederholt Chlamydien-positiv (MAIR u. WILLS 1992). Bis jetzt wurden drei Chlamydienarten bei Pferden beobachtet: *Chlamydophila pneumoniae* (WILLS et al. 1990), *Chlamydophila abortus* (EVERETT et al. 1999) und *Chlamydophila psittaci* (HENNING et al. 2000, SZEREDI et al. 2005).

Chlamydien wurden in Abortmaterial von Stuten nachgewiesen (GLAVITS et al. 1988, BOCKLISCH et al. 1991, HENNING et al. 2000, SZEREDI et al. 2005) und waren in Eileitern und Uteri von Stuten mit Salpingitis und/oder Endometrose immunhistochemisch detektierbar (MEDENBACH et al. 1999). Sie sollen für reduzierte Reproduktionsraten verantwortlich sein (HERFEN et al. 1999, WITTENBRINK 1999). Chlamydien kommen beim Hengst vor, wurden in Ejakulaten verminderter Qualität nachgewiesen (VEZNIK et al. 1996) und werden möglicherweise venerisch auf Stuten übertragen.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Tiere, Reproduktionsmanagement, Gesundheitsstatus

In dieser Arbeit wurden Genitaltrakte von insgesamt 50 Sauen (Jungsauen: n=14; Altsauen: n=36) untersucht; 42 Sauen galten als fruchtbarkeitsgestört (wiederholte Umrausche; keine weiteren klinischen Symptome, wie Vaginalausfluss). Die Wurfnummer der Altsauen variierte zwischen eins und neun. Acht Sauen waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme gravid und galten als fertile Kontrolltiere (Wurfnummer 4 bis 8). Sie waren aufgrund geringer Wurfgröße selektiert und der Normalschlachtung zugeführt worden. Die Tiere stammten aus drei Schweinezuchtbetrieben der Bundesländer Sachsen, Sachsen-Anhalt und Bayern (Tab.2). Die Untersuchungen fanden im Zeitraum von Oktober 1998 bis März 2003 statt.

Alle Tiere wurden in den Herkunftsbetrieben im Rahmen der Integration (Jungsauen) bzw. nach dem Absetzen (Altsauen) brunst- und ovulationssynchronisiert. Dabei kam Altrenogest (nur Jungsauen; zur Zyklusblockade), eCG / PMSG (Jung- und Altsauen; zur Stimulation des Follikelwachstums) und hCG oder das GnRH-Analogon D-Phe6-GnRH (Jung- und Altsauen; zur Ovulationsauslösung) zur Anwendung. Jung- und Altsauen wurden bis zu dreimal künstlich besamt. Regelmäßig wurden die Sauen in den drei Beständen gegen Rotlauf und Parvovirose immunisiert (Parvoruvac[®], Fa. Merial GmbH, Deutschland). In allen Betrieben wurde Fertigfutter verwendet, das von verschiedenen Herstellern stammte. Die Sauen wurden in Abhängigkeit vom Reproduktionsstadium gefüttert. Sauen in der Trächtigkeit erhielten Futter mit durchschnittlich 12,0 MJ ME / kg Futter. Für laktierende Sauen wurden Futterrationen mit Energiegehalten von ca. 13,5 MJ ME / kg Futter eingesetzt. Antikörpertiter gegen Leptospiren konnten in keinem der Tiere nachgewiesen werden. Alle Bestände waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme frei von klassischer Schweinepest, Brucellose, Aujeszky-Krankheit und PRRS (porcine reproductive and respiratory syndrome).

Tab. 2: Einteilung des Untersuchungsmaterials nach Herkunft

	Betrieb	Anzahl der Tiere	davon JS	davon AS
Gruppe I n=20	A	20	8	12
Gruppe II n=22	A	15	4	11
	B	5	3	2
	C	2	1	1
Gruppe III n=8	A	6	-	6
	B	1	-	1
	C	1	-	1

n=Anzahl der Tiere, Gruppe I und II=Gruppen der fruchtbarkeitsgestörten, nicht trächtigen Sauen, Gruppe III=Gruppe der trächtigen Sauen, JS=Jungsauen, AS=Altsauen

3.2 Gewinnung, Einteilung und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

Die Sauen wurden am Schlachthof mit CO₂ betäubt und anschließend ausgeblutet. Dabei wurden pro Sau 10 ml Blut in einer Serum-Monovette[®] aufgefangen und der serologischen Untersuchung zugeführt. Zirka 30 Minuten nach der Tötung der Tiere wurden die Genitalorgane und Gallenblasen entnommen und innerhalb von ca. 2 Stunden zusammen mit dem Blut gekühlt ins Labor transportiert.

Bei 20 fruchtbarkeitsgestörten Tieren (Gruppe I) wurde zunächst nur der linke Eileiter im IFT (Immunfluoreszenztest) untersucht und keine Unterteilung in Ampulle, Isthmus und uterotubale Verbindung vorgenommen. Aufgrund der Ergebnisse der Gruppe I stellte sich die Frage nach dem Vorkommen und der Häufigkeit von Chlamydien in den unterschiedlichen Eileiterabschnitten bzw. ob eine bilaterale Chlamydieninfektion in den Eileitern möglich ist. Aufgrund dieser Fragestellung wurde eine Einteilung in Ampulle, Isthmus und uterotubale Verbindung des linken Eileiters bei den Tieren in Gruppe I in der PCR (Polymerase-Chain-Reaction) vorgenommen. Weiterhin erfolgte dann die Untersuchung beider Eileiter sowie die Einteilung in die Eileitersegmente im IFT und der PCR bei den Tieren der Gruppen II und III.

Ovarien, Eileiter und Uteri wurden getrennt, die den Eileitern und Uteri anhaftenden Bänder wurden entfernt. Die Eileiter wurden an beiden Enden abgebunden, in 70 %igem Ethanol gewaschen und zweimal in PBS (phosphat buffered saline) gespült. Bei 20 fruchtbarkeitsgestörten Tieren (Gruppe I) wurde nur der linke Eileiter gewonnen. Bei den verbliebenen 22 fruchtbarkeitsgestörten Tieren (Gruppe II) und allen 8 tragenden Sauen

(Gruppe III) wurden beide Eileiter entnommen. Die Eileiter wurden entweder sofort nach deren Gewinnung (Gruppen II und III) oder erst später (Gruppe I) in Ampulle, Isthmus und uterotubale Verbindung separiert und Ampulla sowie Isthmus der Sauen der Gruppen II und III transversal in jeweils drei, 1 cm lange Segmente getrennt. Im Gegensatz dazu erfolgte die Trennung der uterotubalen Verbindung (UTV) longitudinal in zwei gleich große Hälften. Das Infundibulum wurde in jedem Fall verworfen.

Bei allen 50 Tieren erfolgte eine Entnahme von Proben aus dem Uterus. Nach ausgiebiger äußerer Reinigung des Uterus mit steriler PBS-Lösung wurde dieser ca. 20 cm von der Hornspitze entfernt mehrfach in Abständen von ca. 3 cm abgebunden und so vier beidseits ligierte Uterussegmente gewonnen.

Die Eileiter der Sauen der Gruppe I wurden *in toto* bei – 20°C gelagert (für den Immunfluoreszenztest = IFT). Alle Segmente beider Eileiter (Ampulla, Isthmus und uterotubale Verbindung) der Sauen der Gruppen II und III sowie des Uterus der Sauen aller Gruppen wurden steril verpackt und bei –20 °C eingefroren (jeweils für IFT und PCR). Ein weiteres Uterussegment wurde unmittelbar nach dessen Gewinnung gekühlt der bakteriologischen Untersuchung zugeführt. Eine bakteriologische Untersuchung des Eileiters unterblieb. Die verbliebenen Segmente von Ampulle und Isthmus (Gruppen II und III) sowie die des Uterus (alle Gruppen) wurden in 4 %igem Formolcalcium für histologische Untersuchungen eingelegt. Die Präparation des Probenmaterials erfolgte mit sterilem Besteck (Schere, Skalpell, Pinzette). Eine Übersicht über die untersuchten Organe bzw. Organsegmente gibt Tabelle 3 wieder. Das je Gruppe untersuchte Probenmaterial ist bei den einzelnen Disziplinen aufgeschlüsselt.

Tab. 3 Einteilung des Untersuchungsmaterials

		Gruppe I (n=20)			Gruppe II (n=22)			Gruppe III (n=8)		
		IFT	PCR	Histo	IFT	PCR	Histo	IFT	PCR	Histo
Anzahl	einer	√	√	√	—	—	—	—	—	—
Eileiter	beide	—	—	—	√	√	√	√	√	√
gesamter EL		√	—	—	—	—	—	—	—	—
Eileiter-segmente	Ampulle	—	√	√	√	√	√	√	√	√
	Isthmus	—	√	√	√	√	√	√	√	√
	UTV	—	√	—	√	√	—	√	√	—
Uterussegment		√	√	√	√	√	√	√	√	—

Die Blutproben wurden für 10 Minuten bei 3.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das gewonnene Serum bei –20 °C eingefroren. Galle wurde durch Punktion der Gallenblase gewonnen, in sterile Röhrchen abgefüllt und bei –20 °C gelagert.

3.3 Makroskopische Untersuchungen der Genitalien

Die ovariellen Funktionskörper wurden in Anlehnung an SCHNURRBUSCH et al. (1981), KAEOKET et al. (2002) und KAUFFOLD et al. (2004) beurteilt. Die ovariellen Funktionskörper, wie Follikel, Corpora lutea, Corpora albicantia und Zysten wurden erfasst, ausgemessen und dazu genutzt, Zyklizität, Zyklusphase und ovarielle Abnormitäten festzustellen. Sauen, die ausschließlich Follikel mit einem Durchmesser von 2-4 mm aufwiesen, wurden als anöstrisch beurteilt. Tiere mit ovariellen Zysten ohne begleitende Corpora lutea wurden als solche mit polyzystischer Ovardegeneration (POD) beurteilt. Tiere mit Follikeln von 5-6 mm mit oder ohne regressierte Corpora lutea (Corpora albicantia) wurden als proöstrisch angesehen. Traten Follikel mit einem Durchmesser von 7-8 mm auf, befand sich das Tier im Östrus. Tiere im frühen Diöstrus (= Metöstrus) wiesen ausschließlich Corpora haemorrhagica auf. Tiere im mittleren Diöstrus hatten Corpora lutea. Im späten Diöstrus wiesen die Tiere regressierende Corpora lutea zusammen mit Follikel bis zu 5 mm Größe auf.

Nach dem Abtrennen der Adnexen (*Ligamentum latum uteri*, Eileiter und Ovar) wurde der Uterus eröffnet. Der Uterus wurde im Grad der endometrialen Durchblutung und Ödematisierung beurteilt, sowie vorhandene Inhalte und Beläge erfasst. Sowohl Ödematisierung wie auch Durchblutung wurden subjektiv eingeschätzt und in vier Grade eingeteilt (Tab.4).

Tab. 4 Score zur makroskopischen Bewertung von endometrialer Ödematisierung und Durchblutung

Score	Bewertung
0	kaum nachweisbar
1	geringgradig
2	mittelgradig
3	hochgradig

3.4 Untersuchungen auf Chlamydien mittels direktem Immunfluoreszenztest (IFT)

Zum Nachweis von Chlamydien in den Genitalorganen wurde ein direkter Immunfluoreszenztest verwendet. Sauen der Gruppe I wurden sowohl im Eileiter als auch Uterus untersucht. Proben von Ampulle, Isthmus und UTV beider Eileiter und von Uteri von insgesamt 17 der 22 der Sauen der Gruppe II und aller 8 tragenden Sauen kam zur Untersuchung (Tab. 5).

Tab. 5 Probenmaterial zur Untersuchung auf Chlamydien mittels direktem Immunfluoreszenztest in den Untersuchungsgruppen I – III

	Eileiter			Uterus
	Tiere total <i>n</i>	Je Tier <i>n</i>	Segmente je Eileiter [†] <i>n</i>	Tiere total <i>n</i>
Gruppe I (n=20)	20	1	—	20
Gruppe II (n=22)	17	2	3	17
Gruppe III (n=8)	8	2	3	8

[†] Segment: Ampulle, Isthmus, uterotubale Verbindung (UTV)

Es wurde ein direkter Immunfluoreszenztest verwendet (Chlamydia Direct IF Identification, bioMérieux sa, Marcy-l'Etoile, Frankreich). Nach Herstellerangaben sind damit alle 15 Serotypen von *Chlamydia trachomatis* sowie *Chlamydia psittaci* zu erfassen. Der Testkit enthält einen mit Fluoreszeinisothiocyanat markierten monoklonalen Antikörper. Das Untersuchungsgut wurde mit Evansblue gegengefärbt. Zu jeder Testserie wurde ein Kontrollobjektträger als Positivkontrolle mitgeführt, der gleichfalls im Testkit enthalten war. Zur Präparation von Zellmaterial aus allen für ein individuelles Tier gewonnenen Proben von Eileiter und Uterus wurde jeweils ein steriles Präparationsbesteck (Skalpell, Schere, Pinzette, Glasstab) genutzt. Das Besteck wurde nach der Bearbeitung eines Segmentes in 70 %igem Ethanol gespült und anschließend abgeflammt. Alle Gewebe wurden schonend im Kühlschrank aufgetaut. Nachdem die Uterussegmente mittels Schere und Pinzette eröffnet waren, wurden mit Hilfe eines Glasstabes Zellen des Endometrium gelöst und auf dem auf Raumtemperatur temperierten Objektträger ausgestrichen. Die Eileiter (*in toto* für Sauen der Gruppe I; je Segment für Eileiter der Sauen der Gruppen II und III) wurden von außen mittels eines Skalpells eröffnet. Nachdem das gewonnene Material auf dem Objektträger luftgetrocknet war, wurden pro Objektträgeraussparung sieben Mikroliter Azeton aufgetragen,

der Objektträger luftgetrocknet und der so fixierte Ausstrich mit einem Tropfen Nachweisreagenz derart benetzt, dass der gesamte Untersuchungsbereich bedeckt war. Es folgte eine 15minütige Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Überschüssige Flüssigkeit wurde anschließend durch seitliches Aufklopfen des Objektträgers auf Filterpapier entfernt, bevor die Proben zwei mal fünf Minuten unter leichtem Schwenken in PBS gewaschen wurden. Überschüssiger Puffer wurde durch seitliches Aufklopfen des Objektträgers entfernt, um unmittelbar danach auf jedes Objektträgerfeld einen Tropfen eines Eindeckmediums aufzubringen und das Präparat mit einem Deckglas zu bedecken. Die Auswertung der Präparate erfolgte innerhalb einer Stunde nach Platzierung des Deckglases unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskopes Axioskop (Carl-Zeiss-Jena GmbH, Jena, Deutschland) bei 1.000-facher Vergrößerung und Verwendung von Immersionsöl.

Bei der Auswertung der Präparate wurde sich streng an der Positivkontrolle orientiert und nur die Strukturen als positiv gewertet, die sowohl in Aussehen als auch Fluoreszenz der Positivkontrolle entsprachen und in Zellen oder am Zellrand lokalisiert waren. Lagen die Strukturen intrazellulär, hatten sie einen Durchmesser von 1 µm und eine ringförmige apfelgrüne Fluoreszenz mit dunklerem Zentrum, handelte es sich um Retikularkörperchen. Extrazelluläre Strukturen mit einem Durchmesser von 0,3 µm und homogener apfelgrüner Fluoreszenz wurden als Elementarkörperchen identifiziert. Beide, Retikular- und Elementarkörperchen wurden als chlamydiotypisch fluoreszierende Partikel ausgewiesen. Ein Präparat galt dann als positiv, wenn mindestens 11 dieser Partikel nachzuweisen waren. Die genaue Einteilung ist Tab. 6 zu entnehmen.

Tab. 6 Score zur Bewertung der Ergebnisse des Immunfluoreszenztests

Score	Anzahl der fluoreszierenden Partikel pro Präparat
0 (negativ)	0–10
1 (schwach positiv)	11–20
2 (mäßig positiv)	21–40
3 (stark positiv)	>40

3.5 Untersuchungen auf Chlamydien mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

3.5.1 DNA-Isolation und PCR

Die molekularbiologischen Untersuchungen erfolgten am Friedrich-Loeffler-Institut (Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit) in Jena und an der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Universität Leipzig.

Mit Hilfe der PCR wurden Proben von Ampulle, Isthmus und UTV beider Eileiter und von Uteri aller Sauen der Gruppe II und III untersucht (Tab. 7). Der linke Eileiter der Sauen der Gruppe I wurde nachträglich in Ampulle, Isthmus und UTV segmentiert und zusammen mit den Uterussegmenten mit Hilfe der PCR analysiert.

Tab. 7 Probenmaterial zur Untersuchung auf Chlamydien mittels PCR in den Untersuchungsgruppen I – III

	Eileiter			Uterus
	Tiere total <i>n</i>	Je Tier <i>n</i>	Segmente je Eileiter [†] <i>n</i>	Tiere total <i>n</i>
Gruppe I (n=20)	20	1	3	20
Gruppe II (n=22)	22	2	3	22
Gruppe III (n=8)	8	2	3	8

[†] Segment: Ampulle, Isthmus, uterotubale Verbindung

Zur DNA-Isolation wurde der High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Isolation erfolgte aus jeweils 25–50 mg Gewebe laut Anleitung des Herstellers. Dem resultierenden Eluat von 200 µl wurde 0,75 VT Isopropanol (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) zugegeben, der Ansatz anschließend für 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das gewonnene Präzipitat in 30 µl Aqua bidest. gelöst. Die PCR beruht auf Amplifikationen des *ompA*-Gens, entsprechend der Vorgabe von KALTENBOECK et. al. (1997) und wurde mit den von SACHSE u. HOTZEL (2003) beschriebenen Modifikationen durchgeführt. Die PCR eignet sich zum Nachweis von *Chlamydia (C.) trachomatis*, *psittaci*, *pneumoniae* und *pecorum*. Es wurde auf *C. trachomatis* und *psittaci* untersucht und der Thermocycler Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die gesamte PCR-Prozedur ist dreistufig: In einer ersten und nachfolgenden zweiten nested PCR wird das Genus nachgewiesen. Die dritte PCR ist ebenfalls eine nested PCR und dient dem Nachweis der Spezies. In den Tabellen 8 und 9 sind die jeweils verwendeten PCR-Primer bzw. deren Sequenzen angeführt.

In der ersten PCR wurde ein 50 µl Ansatz eingesetzt, der folgende Komponenten enthielt:

5,0 µl 10 x *Taq*-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

1,5 µl dNTP-Mix (je 2 mM; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland)

1,0 µl Primer 1 (je 10 pmol/µl; Jena Bio Science, Jena, Deutschland)

1,0 µl Primer 2 (je 10 pmol/µl; Jena Bio Science, Jena, Deutschland)

0,2 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 units/µl; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

36,3 µl Aqua bidest.

5,0 µl DNA-Extrakt.

Die Ansätze für die zweite genus- und dritte speziesspezifische PCR entsprachen dem für die erste PCR. Im Unterschied dazu wurde allerdings jeweils 1,0 µl des Amplifikationsproduktes der vorangegangenen PCR verwendet und 40,3 µl Aqua bidest. eingesetzt.

Tab. 8 Primerpaare und Größe des amplifizierten Fragments

	Primerpaar	Länge des Amplikons
genusspezifische PCR		
1. PCR	191CHOMP/CHOMP371	576-597 bp
nested PCR	201CHOMP/CHOMP336s	434-455 bp
speziesspezifische PCR		
<i>Chlamydia trachomatis</i>	201CHOMP/TRACH269	250 bp
<i>Chlamydia psittaci</i>	218PSITT/CHOMP336s	389-404 bp

Tab. 9 Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')
191CHOMP	GCI YTI TGG GAR TGY GGI TGY GCI AC
CHOMP371	TTA GAA ICK GAA TTG IGC RTT IAY GTG IGC IGC
201CHOMP	GGI GCW GMI TTC CAA TAY GCI CAR TC
CHOMP336	CAA GMT TTT CTG GAY TTM AWY TTG TT
TRACH 269	ACC ATT TAA CTC CAA TGT ARG GAG TG
218PSITT	GTA ATT TCI AGC CCA GCA CAA TTY GTG
Degenerierte Nukleotide: K=G,T; M=A,C; R=A,G; W=A,T; Y=C,T; I=Inosin	

In den Tabellen 10 und 11 sind die verwendeten Temperatur-Zeit-Profile und Zyklenanzahlen dokumentiert.

Tab. 10 Temperatur-Zeit-Profil der genusspezifischen PCR

	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95°C	30 s
35 Zyklen mit:		
Denaturierung	95°C	30 s
Annealing	50°C	30 s
Elongation	72°C	30 s

Tab. 11 Temperatur-Zeit-Profil der speziesspezifischen PCR

	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95°C	30 s
20 Zyklen mit:		
Denaturierung	95°C	30 s
Annealing	60°C	30 s
Elongation	72°C	30 s

Agarose-Gel-Elektrophorese

Die PCR-Fragmente wurden in der Gel-Elektrophorese unter Verwendung von 2%er Agarose (peqGOLD Universal Agarose, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) in TBE-Puffer mit Ethidiumbromid-Zusatz bei 200 V zusammen mit einem DNA-Größenmarker (100 bp-Leiter, superladder-low dsDNA Marker Kit; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) aufgetrennt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und mithilfe der Software „GeneSnap 40000“ bearbeitet und archiviert.

Positiv- und Negativkontrollen

Bei jeder PCR-Reaktion wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen mitgeführt.

Als Positivkontrolle diente DNA der jeweiligen Spezies. Sie wurde freundlicherweise vom Friedrich-Loeffler-Institut in Jena zur Verfügung gestellt. DNA von *Chlamydophila psittaci* (interne Bezeichnung: DC 24) und *Chlamydia suis* (interne Bezeichnung: DC 8/98) fand Verwendung.

Als Negativkontrolle wurde Aqua bidest. eingesetzt. Um die PCR-Prozedur in Gänze und jeden einzelnen Schritt separat zu kontrollieren, wurde jeweils 1 ml der vorangegangenen in der nachfolgenden PCR eingesetzt und bei jeder nachfolgenden (zweite und dritte) PCR eine neue Negativkontrolle angesetzt, so dass letztlich drei Reaktionsansätze als Negativkontrolle mitgeführt wurden.

Puffer und Lösungen

Die nachfolgend aufgeführten Lösungen waren herzustellen. Alle anderen waren vorgefertigt in den jeweiligen Kits enthalten.

Die jeweiligen Grundstoffe stammten gänzlich von der Firma Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland).

TBE-Puffer (Tris-Borsäure-EDTA), 10x pH 8,3

TRIS-Base	1,0 M
Borsäure	0,85 M
EDTA	0,5 M

Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg/ml

DNA-Ladepuffer, 10 ml bestehend aus:

Bromphenolblau	20 mg
Glycerin (80%)	6 ml
EDTA 0,5 M	4 ml

3.5.2 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierung erfolgte am Friedrich-Loeffler-Institut (Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit) in Jena.

Positive PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde die DNA extrahiert und anschließend in den Reaktionsansatz eingesetzt. Für die DNA-Sequenzierung wurden zwei Reaktionsansätze mit jeweils unterschiedlichen Primern (Primer 201 bzw. Primer 336) eingesetzt. Der erste Primer liest den DNA-Strang vom 3'-5' Ende, der zweite vom 5'-3' Ende.

Der Ansatz enthielt 10 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

- 2,5 µl ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- 2 µl des eluierten DNA-Fragments
- 1 µl Primer 201 (3,2 pmol/µl ; für Reaktionsansatz 1) Primer 336 (3,2 pmol/µl; für Reaktionsansatz 2)
- 4,5 µl Aqua bidest.

Das Temperatur-Zeit-Profil der Sequenzierreaktion ist Tab.12 zu entnehmen.

Tab. 12 Temperatur-Zeit-Profil der Sequenzierreaktion

	Temperatur	Zeit
25 Zyklen mit:		
Denaturierung	96°C	30 s
Annealing	50°C	15 s
Elongation	60°C	240 s

Nach der Sequenzierungsreaktion wurde die DNA mit 1/10 Vol. Natriumacetat (3M; pH 4,6) und 2,5 Vol. Ethanol (96 %) gefällt, für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Natriumacetat wurde mit 70 %igem Ethanol herausgewaschen, die Lösung zentrifugiert und der Überstand nochmals verworfen. Anschließend wurde das DNA-Pellet in Wasser gelöst und dem Sequenzierautomaten (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) zugeführt. Die erhaltene Speziessequenz, basierend auf der *ompA* Teilsequenz, wurde mit Hilfe von BLAST der Datenbank des National Center of Biotechnology Information Bethesda, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) auf Homologien mit bisher bekannten Sequenzen verglichen.

3.6 Histologische Untersuchung der Genitalien

Histologisch beurteilt wurden 38 reproduktionsgestörte Tiere (Gruppe I und II). Das histologisch beurteilte Probenmaterial ist in der Tabelle 13 dargestellt. Neunzehn der 20 Sauen der Gruppe I wurden in der Ampulle und im Isthmus des linken, 21 Sauen der Gruppe II und alle tragenden Tiere (Gruppe III) in entsprechenden Segmenten beider Eileiter histologisch untersucht. Die Eileiter von zwei Tieren waren aufgrund von Präparationsfehlern nicht auswertbar. Mit Ausnahme der tragenden Sauen sowie vier Sauen (ein Tier der Gruppe 1 und drei Tiere der Gruppe 3) die mit ovariellen Zysten und somit Ödematisierung, Durchblutung und Immunzellgehalt des Endometriums nicht mit physiologischen Daten verglichen werden konnten, wurden alle übrigen Uteri histologisch beurteilt.

Tab. 13 Probenmaterial zur histologischen Untersuchung in den Untersuchungsgruppen I–III

	Eileiter			Uterus
	Tiere total <i>n</i>	Je Tier <i>n</i>	Segmente je Eileiter ¹ <i>n</i>	Tiere total <i>n</i>
Gruppe I (n=20)	19	1	2	19
Gruppe II (n=22)	21	2	2	19
Gruppe III (n=8)	8	2	2	---

¹ Segment: Ampulle, Isthmus, uterotubale Verbindung

Das in 4 %igem Formolcalcium fixierte Untersuchungsmaterial wurde in Paraffin eingebettet und nach Anfertigung eines 3–5 µm dicken Schnittes mit Hämalaun–Eosin (Hämalaun nach Meyer) gefärbt. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem binokularen Mikroskop (Axiovert 200, Carl–Zeiss–Jena, Deutschland).

3.6.1 Histologische Untersuchungen des Uterus

Alle Präparate wurden hinsichtlich Durchblutung und Ödematisierung sowie der Anzahl Immunzellen im Endometrium beurteilt. Der Grad der Durchblutung wurde bei einer Vergrößerung x 200 anhand der Anzahl vorhandener Gefäßanschnitte ermittelt und als Score ausgegeben (Tab. 14). Die endometriale Ödematisierung wurde subjektiv beurteilt und in „kaum nachweisbar“, „geringgradig“, „mittelgradig“ und „hochgradig ausgeprägt“ eingeteilt.

Tab. 14 Score zur histologischen Bewertung von endometrialer Durchblutung¹

Score	Anzahl der Gefäßanschnitte je Gesichtsfeld
0	0 - 15
1	16 - 30
2	31 - 45
3	> 45

¹ Die Untersuchungen erfolgten bei einer Vergrößerung x 200.

Vorhandene Immunzellen (Lymphozyten, Plasmazellen, neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) wurden in 19 sich nicht überlappenden Gesichtsfeldern je Präparat bei einer Vergrößerung von x 400 ausgezählt. Wie in Abbildung 5 dargestellt, waren 10 dieser 19 Felder dabei in der subepithelialen Schicht, 3

Felder im *Stroma endometrii superficialis*, 3 Felder im mittleren *Stroma endometrii* und 3 Felder im *Stroma endometrii profunda* lokalisiert. Aus den Ergebnissen der 10 ausgezählten subepithelialen und 9 stromalen Gesichtsfelder wurden die Mittelwerte gebildet und als durchschnittliche Anzahl Immunzellen der einzelnen endometrialen Schichten einer individuellen Sau ausgegeben. Die Auswertung der histologischen Befunde der Uteri erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von LEISER et. al. (1988), KAEOKET et. al. (2002) und KAUFFOLD et. al. (2005). Da die Immunzellen erheblich zyklusabhängig in ihrer Anzahl schwanken, wurde bei der Beurteilung der Ergebnisse die Zyklusphase, wie sie anhand der Ovarbefunde ermittelt wurde, berücksichtigt.

Die Endometrii wurden anschließend als intakt oder entzündet eingeschätzt. Dabei wurde sich an DE WINTER et. al. (1995), KAEOKET et. al.(2002), DALIN et. al. (1997, 2004) und DALIN (persönliche Mitteilung 2003) orientiert. Entzündungen wurden als akut, akut-chronisch oder chronisch bewertet.

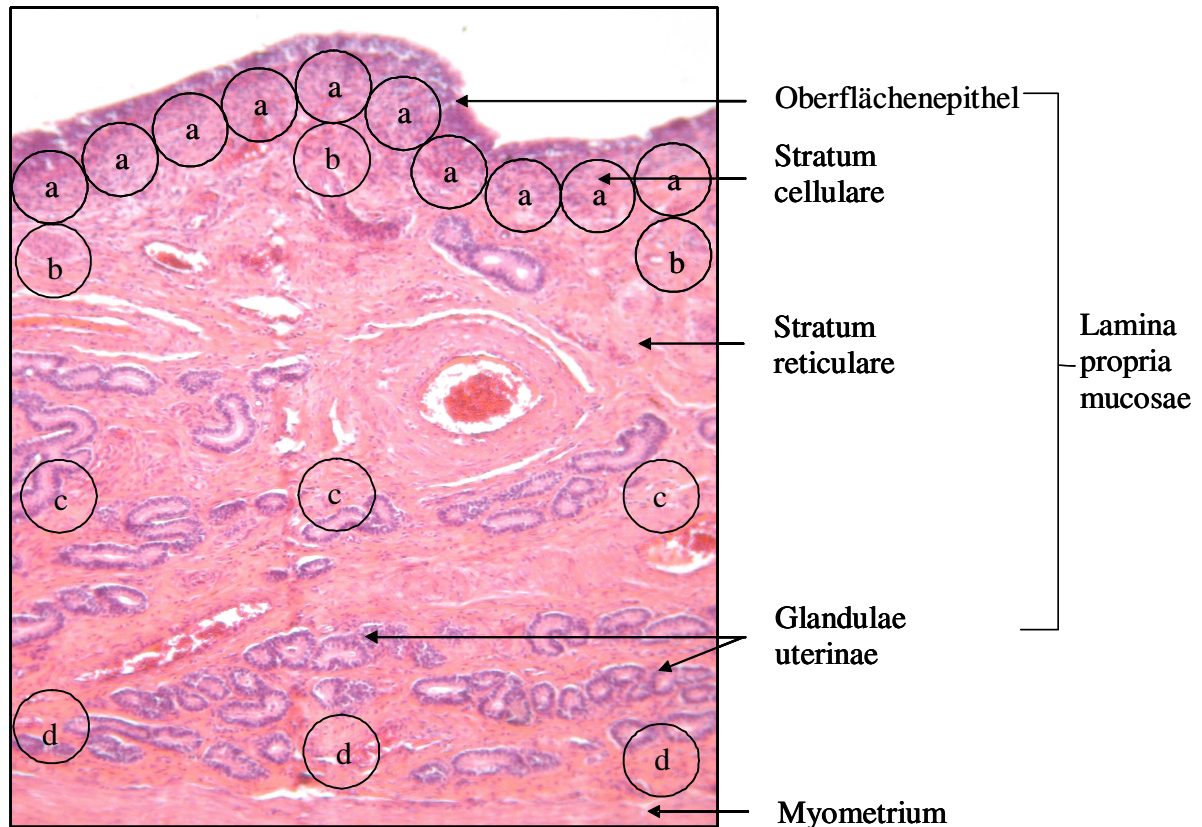


Abb. 5 Darstellung der Anordnung der Gesichtsfelder, die in einem histologischen Uteruspräparat bei einer Vergrößerung x 400 ausgezählt wurden. a = 10 Felder der subepithelialen Schicht; b = 3 Felder des Stroma endometrii superficialis. c = 3 Felder der mittleren Schicht des Stroma endometrii; d = 3 Felder des Stroma endometrii profunda. Aus den Ergebnissen der 10 ausgezählten subepithelialen und 9 stromalen Gesichtsfelder wurden die Mittelwerte gebildet und als durchschnittliche Anzahl Immunzellen der einzelnen endometrialen Schichten einer individuellen Sau ausgegeben.

Eine akute Endometritis wurde dann diagnostiziert, wenn im Proöstrus und Ööstrus subepithelial >20 neutrophile Granulozyten nachzuweisen waren. Gleicher Befund wurde erhoben, wenn im frühen, mittleren und späten Diöstrus >5 neutrophile Granulozyten subepithelial beobachtet wurden. Stromal lokalisierte neutrophile Granulozyten wurden unabhängig vom Zyklusstand immer als Zeichen einer akuten Endometritis betrachtet. Einzige Ausnahme war, wenn neutrophile Granulozyten im Ööstrus offensichtlich aus Blutgefäßen in subepitheliale Bereiche migrierten (DALIN, persönliche Mitteilung 2003).

Eine chronische Endometritis wurde dann diagnostiziert, wenn unabhängig von der Zyklusphase >15 Lymphozyten in der subepithelialen Schicht und/oder >5 Lymphozyten im Stroma endometrii und/oder >5 Plasmazellen lokalisationsunabhängig zu beobachten waren. Als chronische Endometritis wurde auch das Auftreten herdförmiger Anhäufungen von Lymphozyten und/oder Plasmazellen oder beider Zelltypen zeitgleich bewertet.

Lagen zeitgleich Merkmale der akuten und chronischen Endometritis vor, wurde eine akut-chronische Endometritis diagnostiziert.

Obwohl die Anzahl der eosinophilen Granulozyten nicht in die Bewertung der Intaktheit des Endometriums einging, wurden sie in ihrer Anzahl in Anlehnung an KAEOKET et al. (2002) als physiologisch oder pathologisch bewertet. Als pathologisch wurde angesehen, wenn im Diöstrus subepithelial >20, im Proöstrus, Ööstrus oder Metöstrus >5 eosinophile Granulozyten vorkommen und/oder eosinophile Granulozyten im Stroma endometrii unabhängig vom Zyklustag beobachtet wurden.

3.6.2 Histologische Untersuchungen des Eileiters

Die Präparate wurden bei einer Vergrößerung von x 200 durchmustert und der Grad der Durchblutung (Tab. 15), Ödematisierung und das Vorkommen von Sekretvesikeln (Tab.16) beurteilt. Der Grad der Durchblutung wurde bei einer Vergrößerung x 200 anhand der Anzahl vorhandener Gefäßanschnitte ermittelt und als Score ausgegeben. Die Ödematisierung wurde subjektiv in Abhängigkeit von deren Ausprägung in „kaum nachweisbar“ über „geringgradig“, „mittelgradig“ bis „hochgradig“ eingeteilt.

Tab. 15 Score zur histologischen Bewertung der Durchblutung¹

Score	Anzahl der Gefäßanschnitte je Gesichtsfeld
0	0 - 15
1	16 - 30
2	31 - 40
3	> 40

¹ Die Untersuchungen erfolgten bei einer Vergrößerung von x 200.

Tab. 16 Score zur histologischen Bewertung des Vorkommens von Sekretvesikeln¹

Score	Vorkommen von Sekretvesikeln
0	vereinzelt
1	wenige, regelmäßig verteilt
2	viele, regelmäßig verteilt
3	massenhaft, fokale Zottenverklebungen

¹ Die Untersuchungen erfolgten bei einer Vergrößerung x 200.

Bei einer Vergrößerung x 400 wurden jeweils 3 Zotten an deren Basis, Mitte und Spitze untersucht (Abb. 6) und die Anzahl der Immunzellen je Feld mit einer Größe von 10.000 μm^2 ermittelt. Die Gesichtsfelder wurden so platziert, dass sie nicht überlappten und die Beurteilung sowohl epithelialer wie auch subepithelialer und stromaler Schichten zuließen. Aus allen 9 für ein Präparat analysierten Feldern wurde der Mittelwert errechnet, diese auf ein Feld 0,0625 mm^2 konvertiert und als jeweiliges Ergebnis für das entsprechende Präparat (Eileiterabschnitt) ausgewiesen. Diese Konvertierung war notwendig, um die Ergebnisse dieser mit denen der Studie von JIWAKANON et al. (2005) vergleichen zu können, die erstmalig Angaben zur Anzahl und Verteilung von Immunzellen in unterschiedlichen Abschnitten des intakten Eileiter des Schweines machten.

Die Eileitersegmente wurden als unauffällig erachtet, wenn in der Ampulle ≤ 37 Lymphozyten und/oder ≤ 11 Plasmazellen und/oder ≤ 3 neutrophile Granulozyten und/oder ≤ 2 eosinophile Granulozyten bzw. im Isthmus ≤ 17 Lymphozyten und/oder ≤ 8 Plasmazellen und/oder ≤ 1 neutrophile Granulozyten und/oder ≤ 1 eosinophile Granulozyten ermittelt wurden.

Neben Immunzellen wurden intraepitheliale Zysten, Bindegewebszubildungen, intraluminaler Detritus und Zottenatrophie dokumentiert.

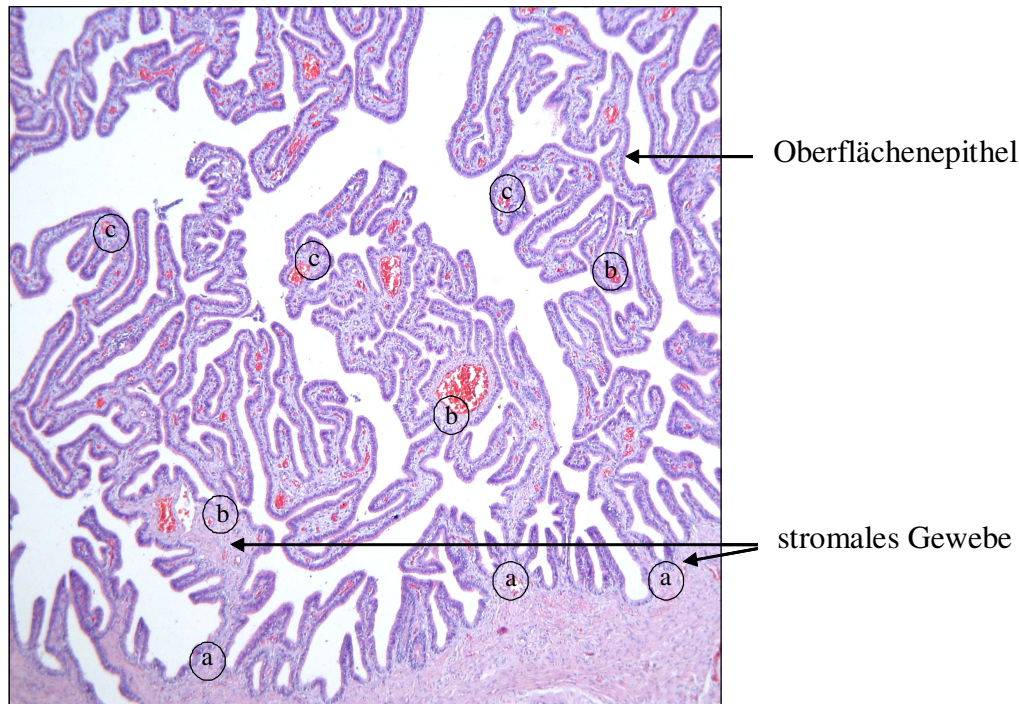


Abb. 6 Darstellung der Anordnung der Gesichtsfelder, die in einem histologischen Eileiterpräparat bei einer Vergrößerung x 400 ausgezählt wurden. a = 10 Felder im Bereich der Zottenbasis; b = 3 Felder im Bereich der Zottenmitte; c = 3 Felder im Bereich der Zottenspitze

3.7 Mikrobiologische Untersuchungen

Die bakteriologischen Untersuchungen wurden durch die Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen, Standort Wiederitzsch, und durch das Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig durchgeführt.

Zum Nachweis aerober Bakterien wurden Columbia-Blut-Agar (Merieux) und Gassner-Agar (Sifin, Berlin, Deutschland) verwendet. Um Pilze und Hefen nachweisen zu können, wurde der Sabouraud-Agar (Sifin) eingesetzt.

Zum Nachweis anaerob wachsender Bakterien fanden der Anaerobiertopf (Merck, Darmstadt, Deutschland) und das „Anaerocult“-Pack (Merck) Verwendung. Die Nährböden wurden mit dem Untersuchungsmaterial beimpft und 24 bis 48 Stunden bei 37° Celsius bebrütet. Anschließend erfolgte eine makroskopische und mikroskopische Beurteilung hinsichtlich der Morphologie der Kolonien, Hämolyse und der Gramfärbung. Um eine Reinkultur zu erhalten, wurde eine Subkultivierung durchgeführt und anschließend die Erreger anhand biochemischer und serologischer Eigenschaften differenziert. Parallel zur Anfertigung der Direktkultur wurde in der Anreicherungskultur das flüssige Nährmedium Nährbouillon II (Sifin) mit dem

Untersuchungsmaterial beimpft und 24 bis 48 Stunden bei 37° Celsius bebrütet. Anschließend wurden die Bakterien auf festem Nährboden isoliert (Columbia-Blut-Agar). Das Wachstum von Bakterien, Pilzen und Hefen wurde quantitativ (Anzahl Kolonien, Tab. 17) und qualitativ (Spezies; Tab. 18) bewertet. Die nachgewiesenen Mikroorganismen wurden als Normalflora (d.h. physiologisch), potenzielle Kontaminanten (fragliche Befunde) und opportun fakultativ pathogene bzw. obligat pathogene Mikroorganismen eingeteilt. Aus den Ergebnissen der qualitativen und quantitativen Analyse wurde ein Score zur Bewertung der mikrobiologischen Befunde erarbeitet (Tab. 19).

Tab. 17 Quantitative Beurteilung des bakteriellen Keimgehaltes

Anzahl der Kolonien / Platte	Beurteilung des Keimgehaltes
1-30	geringgradig
30-100	mittelgradig
> 100	hochgradig

Tab. 18 Einteilung der Mikroorganismen

physiologische bzw. Normalflora	potenzielle Kontamination, (fragliche Befunde)	fakultative pathogene Mikroorganismen	obligat pathogene Bakterienspezies
Laktobazillen	Aerobe Sporenbildner (<i>Bacillus spp.</i>)	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
Sarzinen	Aspergillus, Mucor	kommensale Streptokokken (z.B. <i>Streptococcus epidermis</i> , vergürnende Streptokokken)	<i>Staphylococcus aureus</i>
Mikrokokken	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Corynebacterium spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Actinobaculum (Eubacterium) suis</i> kommensale Enterobakterien (Proteus, Klebsiellen, außer <i>E.coli</i>) <i>Candida spp.</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i> <i>Staphylococcus intermedius</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae spp. dysgalactiae</i> <i>Streptococcus suis</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>E.coli</i> Serovare

Tab. 19 Score zur Bewertung der mikrobiologischen Befunde

Score	Mikrobiologischer Befund
1	physiologische Flora
2	potenzielle Kontamination, Nachweis im Anreicherungsverfahren
3	geringgradig fakultativ pathogene Flora
4	mittelgradig fakultativ pathogene Flora bzw. geringgradig obligat pathogene Flora
5	hochgradig fakultativ pathogene Flora bzw. mittelgradig obligat pathogene Flora
6	hochgradig obligat pathogene Flora

3.8 Mykotoxikologische Untersuchungen

Die Untersuchungen auf Zearalenon in der Gallenflüssigkeit wurden durch das Professor Hellriegel Institut e.V. (Prof. Dr. Schellenberg) der Fachhochschule Anhalt in Bernburg durchgeführt. Insgesamt gelangte Gallenflüssigkeit von 27 Tieren der Gruppen I und II zur Untersuchung, während bei 15 reproduktionsgestörten Sauen derselben Gruppen und Tieren der Gruppe III keine Untersuchungen erfolgten. Zur Analyse wurden 4 ml Gallensaft mit 100 µl 1 mol HCl auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt, der Ansatz wurde bei 2.000 U / min für 2 min zentrifugiert, 2,5 ml des Überstandes in ein Reagenzglas überführt, mit 2,5 ml β -Glucuronidase (1.000 Einheiten/ml; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) versetzt und anschließend bei 37° Celsius 24 Stunden inkubiert. Die Probe (5ml) wurde auf 20 ml mit SÖRENSEN-Puffer (pH 6,8) aufgefüllt und direkt auf eine Extrelutsäule NT 20 (Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von 15 Minuten wurde das Mykotoxin mit 40 ml Essigsäureethylester (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) von der Säule eluiert. Der Essigsäureethylester wurde eingetrocknet und die Probe mit Stickstoff begast. Anschließend wurde die Probe in 2 ml Methanol gelöst und über einen 0,45 µm Membranfilter (Schleicher-Schüll GmbH, Dassel, Deutschland) gereinigt und mittels HPLC analysiert. Bei einer Säulentemperatur von 20 °C und einer Flussrate von 1 ml/min wurde ein Injektionsvolumen von 20 µl in das HPLC-System (HP S 1100; Hewlett Packard Company, Palo Alto, CA, USA) eingesetzt. Reprosil PUR C18 AQ 5µm, 250 x 4 mm (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) wurde als Trennsäule und Acetonitril / Wasser (58/42, isokratisch) als Elutionsmittel verwendet. Der Nachweis wurde mit einem Fluoreszenzdetektor (Exzitations- und Emissionswellenlänge: 236 und 445 nm) durchgeführt. In Anlehnung an die Angaben von

MEYER et. al. (2000) wurden die Tiere mit Werten <50 ng/ml Gallenflüssigkeit als Zearalenon-negativ und bei Werten ≥ 50 ng/ml als Zearalenon-positiv beurteilt.

3.9 Statistische Auswertungen

Die Daten wurden statistisch mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS (Version 12, SPSS GmbH, München) ausgewertet. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-Test. Als deskriptive Statistik wurden Median und 1. sowie 3. Quartil berechnet. Die Signifikanzprüfungen erfolgten mit dem U-Test nach Mann-Whitney. Eine Signifikanzprüfung der skalierten Merkmale (qualitative Merkmale, z.B. Zearalenon und DON) erfolgte mit Kontingenztafeln und dem χ^2 -Test nach Pearson bzw. dem exakten Test nach Fisher. Die Korrelationsberechnungen erfolgten mit dem Spearman-Korrelationskoeffizienten. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p \leq 0,05$ galten als signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung

Lediglich ein Tier der Gruppen I und II (n=42) befand sich im Östrus. Die überwiegende Mehrheit konnte im Diöstrus (n=28 von 42) eingestuft werden (Abb. 7). Des Weiteren wiesen zahlreiche Tiere (n=9) einen Anöstrus auf. Ein nicht unerheblicher Teil der Tiere hatte polyzystische Ovardegeneration. Tiere im Proöstrus wurden nicht beobachtet.

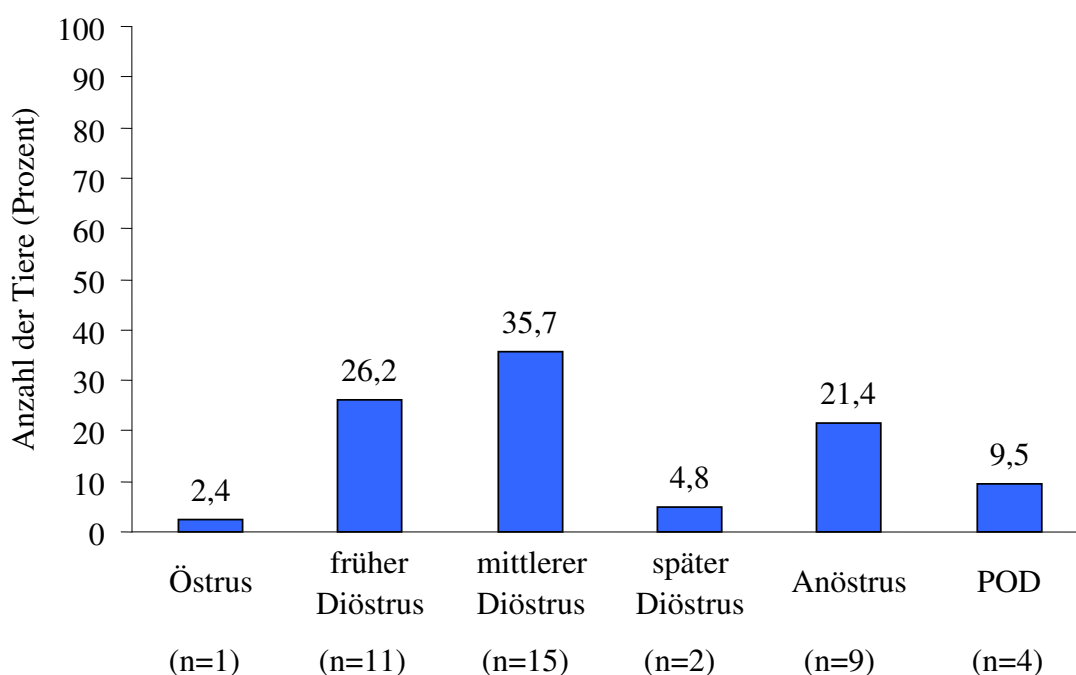


Abb. 7 Bewertung der Ovarbefunde (Zyklusphase, Abnormitäten) der Sauen der Gruppen I und II (n=42); POD = polyzystische Ovardegenerationen

Der Grad der makroskopisch diagnostizierten endometrialen Ödematisierung und Durchblutung variierte (Tab. 20).

Tab. 20 Grad der makroskopisch diagnostizierten endometrialen Ödematisierung und Durchblutung

Score	Grad der endometrialen Ödematisierung		Grad der endometrialen Durchblutung	
	total <i>n</i>	Prozent %	total <i>n</i>	Prozent %
0	7	16,6	8	19,0
1	12	28,6	11	26,2
2	12	28,6	10	23,8
3	11	26,2	13	31,0

Die Uteri von vier reproduktionsgestörten Tieren enthielten eine klare, gelbe bis bernsteinfarbene Flüssigkeit. Jeweils in einem Fall konnten diffus verteilte, bräunliche Beläge bzw. follikuläre Bläschen des Endometriums beobachtet werden.

4.2 Ergebnisse der immunfluoreszenzmikroskopischen (IFT) Untersuchung

Die Ergebnisse der IFT-Untersuchung sind in den Abbildungen 8–10 dargestellt. Um die Ergebnisse transparenter zu machen, wurden zudem die relativen Prävalenzraten je Eileitersegment bzw. für den Uterus ermittelt (Quotient der Ergebnisse des IFT, d.h. der Scores und Anzahl untersuchter Gewebe).

In Gruppe I konnten bei insgesamt 12 (60%) Sauen Chlamydien im Eileiter und bei 13 (65%) im Uterus nachgewiesen. Zeitgleich im Eileiter und Uterus waren 10 Sauen positiv und 5 Sauen negativ. In Gruppe II wurden Chlamydien bei 13 (76%) Tieren im Eileiter und 7 (41%) im Uterus nachgewiesen. Eine gleichzeitige Infektion beider Organe lag bei 7 dieser Sauen vor. Sauen der Gruppe II waren in einem ($n=2$) oder beiden ($n=11$) Eileitern positiv. Uteri der Sauen der Gruppe I hatten höhere relative Prävalenzraten als im Eileiter. Signifikante Unterschiede konnten nicht ermittelt werden (Abb. 8). Unterschiede gab es zwischen Eileitersegmenten, wie in Abbildung 9 für Sauen der Gruppe II dargestellt. Von Ausnahmen abgesehen, nahm die relative Prävalenzrate vom Uterus zur Ampulle hin ab. Korrespondierende Segmente des rechten und linken Eileiters differierten nur minimal.

Fünf (62,5%) der acht tragenden Tiere (Abb. 10) waren im IFT positiv. Die relativen Prävalenzraten der Ampullen und Uteri waren niedriger als die von Isthmus und UTV. Daten des rechten und linken Eileiters ähnelten sich. Es wurden zum Teil höhere Werte als bei Sauen der Gruppe II ermittelt, da vor allem eine Sau sehr stark mit Chlamydien belastet war. Signifikante Unterschiede konnten nicht ermittelt werden.

Abbildung 11 zeigt einen positiven fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Chlamydienantigen.

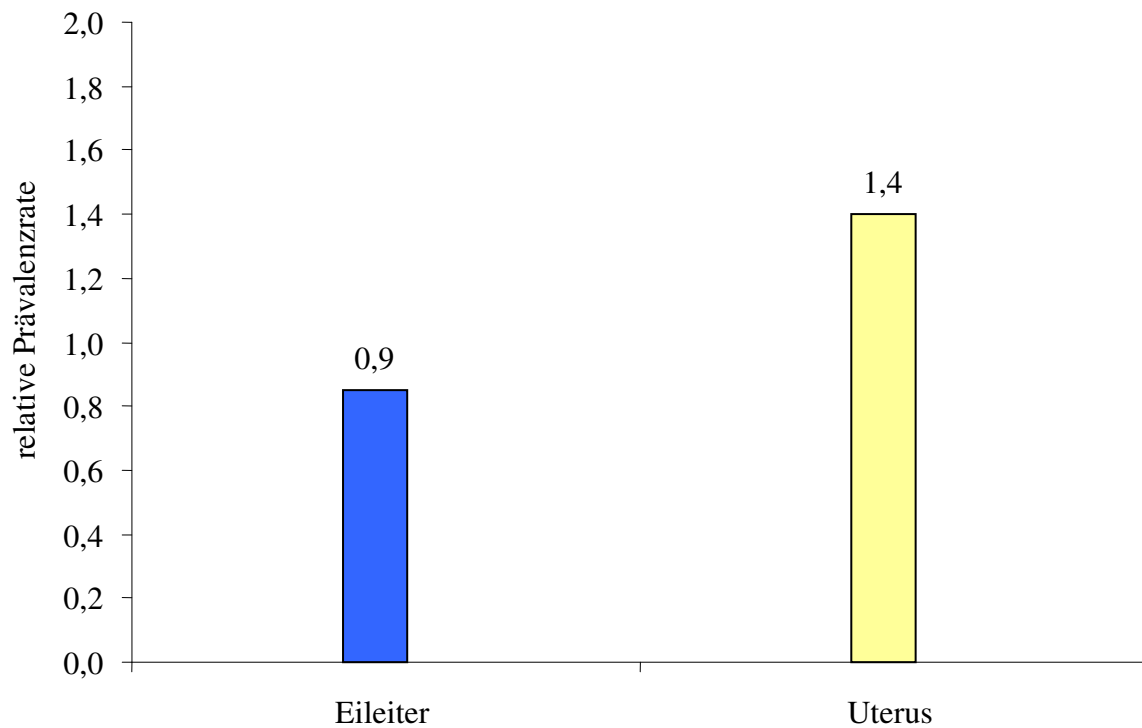


Abb. 8 Relative Prävalenzrate von Eileiter und Uterus der Sauen der Gruppe I (n=20). Es konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

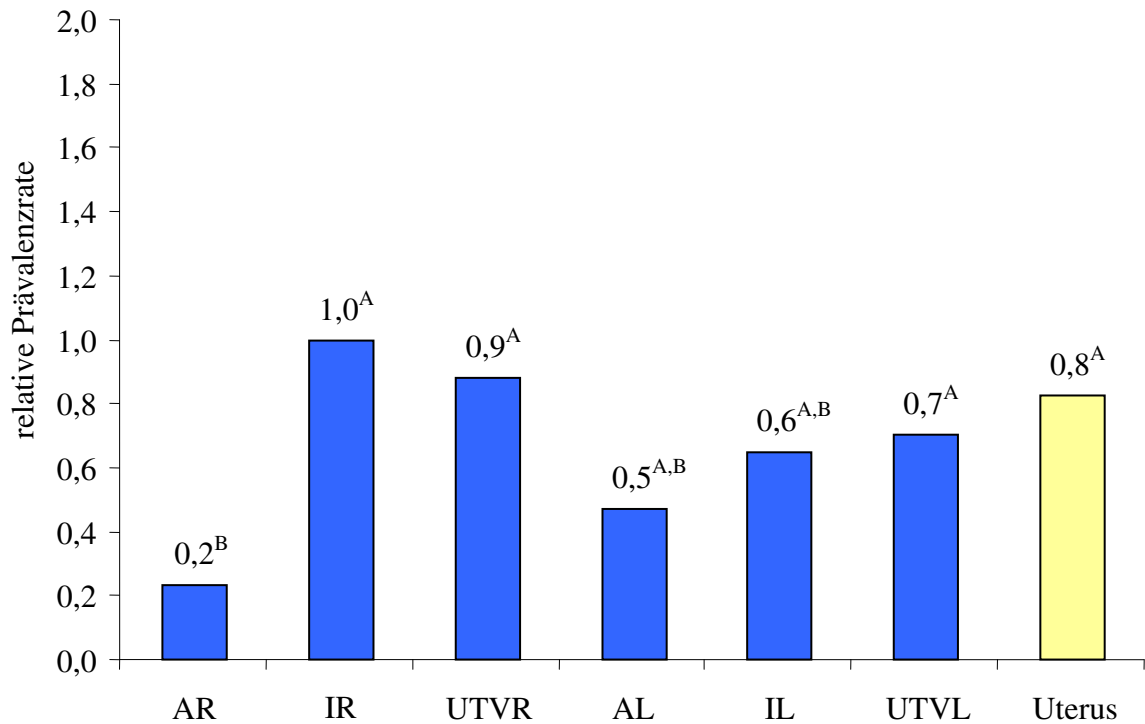


Abb. 9 Relative Prävalenzrate von Eileiter und Uterus der Sauen der Gruppe II (n=17); AR=Ampulle rechts, AL=Ampulle links, IR=Isthmus rechts, IL=Isthmus links, UTVR=uterotubale Verbindung rechts, UTVL=uterotubale Verbindung links; ^{A,B} Werte unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$).

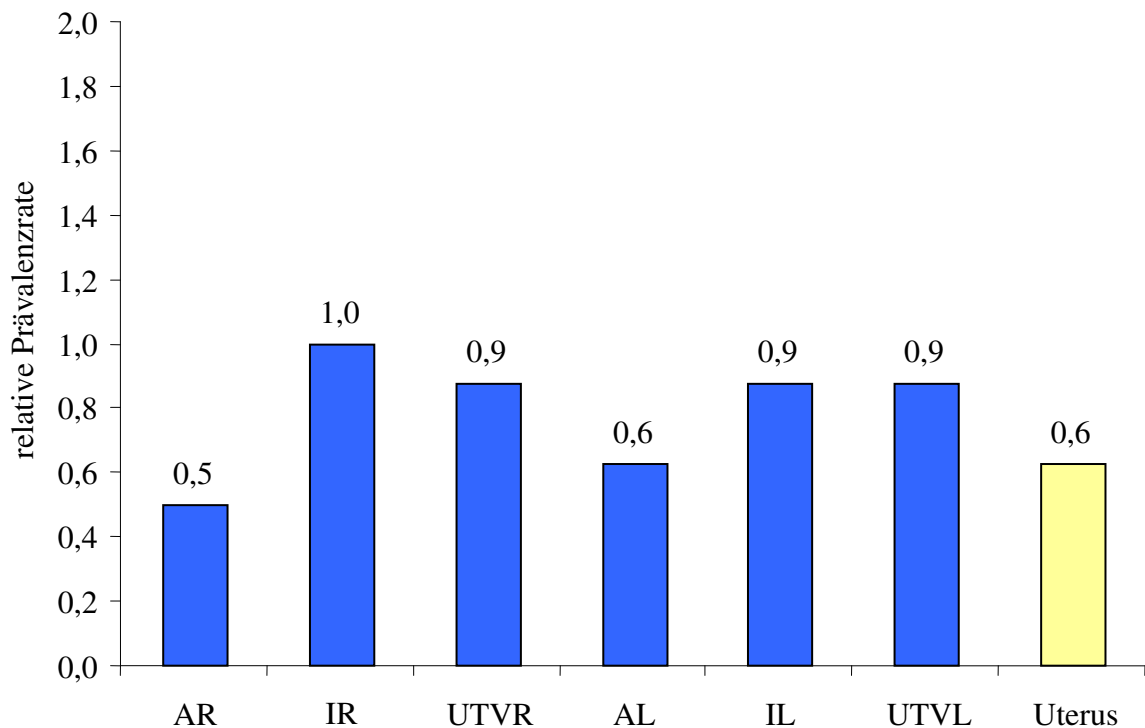


Abb. 10 Relative Prävalenzrate von Eileiter und Uterus der Sauen der Gruppe III (n=8); AR=Ampulle rechts, AL=Ampulle links, IR=Isthmus rechts, IL=Isthmus links, UTVR=uterotubale Verbindung rechts, UTVL=uterotubale Verbindung links. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

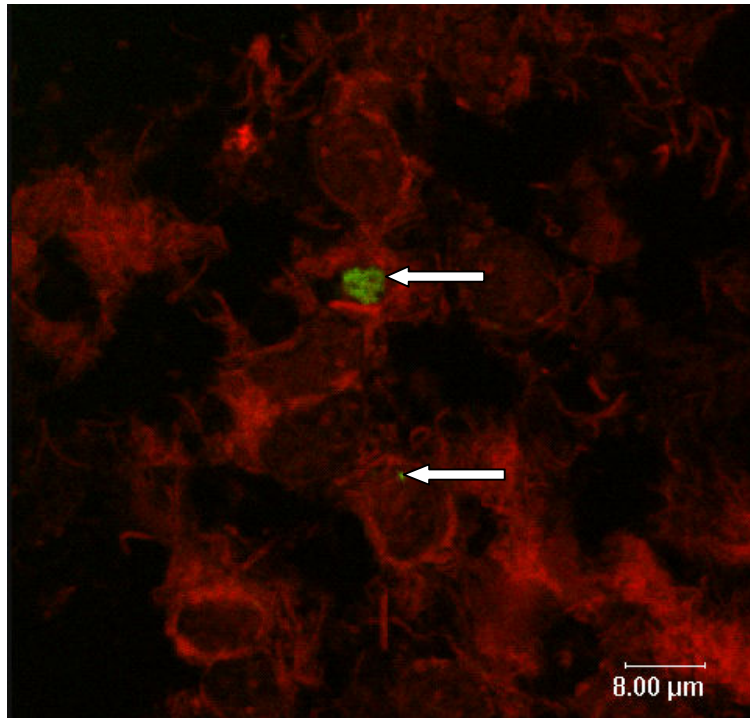


Abb. 11 Uterusabstrich mit Chlamydieneinschlüssen, die apfelgrün fluoreszieren (Pfeile). Die Epithelzellen sind rötlich angefärbt.

4.3 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

Insgesamt wurden 50 Tiere mit Hilfe der PCR auf das Vorkommen von Chlamydien untersucht. Der überwiegende Teil der positiven Amplifikate wurde sequenziert. In der Abbildung 12 ist ein Agarosegel mit typischen PCR-Produkten bei positivem Chlamydienbefund dargestellt.

In Gruppe I (Tab. 21) konnten bei insgesamt 7 (35%) Sauen Chlamydien im Eileiter und bei 6 (30%) Sauen im Uterus nachgewiesen werden. Eine dieser Sauen war in beiden Organen positiv. In Gruppe II (Tab. 22) wurden Chlamydien bei 12 (54,5%) Tieren im Eileiter und 8 (36,4%) im Uterus nachgewiesen. Eine gleichzeitige Infektion beider Organe lag bei 6 dieser Sauen vor. Je 4 Tiere der Gruppe I und II waren nur in einem Eileitersegment positiv, während bei 3 bzw. 8 Sauen gleicher Gruppen mehrere Eileitersegmente zeitgleich Chlamydien enthielten. Sauen der Gruppe II waren zu gleichen Anteilen in einem (n=6) oder beiden (n=6) Eileitern positiv. Mithilfe der dreistufigen PCR nach KALTENBOECK et al. (1997) wurde *Chlamydia psittaci* in 28 Proben festgestellt, während *Chlamydia trachomatis* in 18 Proben zu diagnostizieren war. Mischinfektionen mit beiden Spezies traten bei 3 Proben auf. Insgesamt wurden 33 PCR-Produkte sequenziert. *Chlamydia psittaci*^A (n=18) überwog. *Chlamydia suis*^B (n=10) folgte an zweiter Stelle. Sporadisch wurden *Chlamydia*

trachomatis^C (n=3) und *Chlamydophila abortus*^C(n=2) nachgewiesen. ^{A-C} Werte unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$).

Vier tragende Tiere (50 %) (Gruppe III; Tab. 23) waren Chlamydia-positiv. Drei der vier Tiere waren im Uterus positiv. Drei Sauen wiesen gleichzeitig eine Infektion eines oder beider Eileiter auf. *Chlamydia psittaci* überwog (n=8). In einer Probe wurde zudem *Chlamydia trachomatis* diagnostiziert. Wie auch bei reproduktionsgestörten Sauen wurde vor allem *Chlamydophila psittaci* (n=6), seltener *Chlamydophila abortus* (n=2) sequenziert ($p \leq 0,05$).

Tab. 21 PCR- und Sequenzierergebnisse der Gruppe I.

Tier		Ampulle	Isthmus	UTV	Uterus
1	PCR	negativ	negativ	negativ	<i>C.trach</i>
	Seq.	---	---	---	<i>C.trach</i>
2	PCR	negativ	negativ	negativ	<i>C.trach</i>
	Seq.	---	---	---	<i>C.trach</i>
3	PCR	negativ	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt</i>	negativ
	Seq.	---	<i>Cp.psitt</i>	<i>Cp.psitt</i>	---
4	PCR	negativ	<i>C.trach</i>	negativ	negativ
	Seq.	---	<i>C.suis</i>	---	---
5	PCR	negativ	<i>C.trach</i>	negativ	negativ
	Seq.	---	<i>C.suis</i>	---	---
6	PCR	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt</i>	<i>C.trach</i>	negativ
	Seq.	<i>Cp.psitt</i>	<i>Cp.psitt</i>	<i>C.suis</i>	---
7	PCR	<i>C.trach</i>	<i>C.trach</i>	negativ	negativ
	Seq.	---	---	---	---
8	PCR	negativ	negativ	<i>C.trach</i>	negativ
	Seq.	---	---	<i>C.suis</i>	---
9	PCR	negativ	negativ	negativ	<i>C.trach</i>
	Seq.	---	---	---	<i>C.suis</i>
10	PCR	<i>C.trach</i>	negativ	negativ	<i>C.trach</i>
	Seq.	<i>C.suis</i>	---	---	<i>C.trach</i>
11	PCR	negativ	negativ	negativ	<i>C.trach</i>
	Seq.	---	---	---	<i>C.suis</i>
12	PCR	negativ	negativ	negativ	<i>C.psitt</i>
	Seq.	---	---	---	<i>Cp.abortus</i>
PCR	n	3/12	5/12	3/12	6/12
positiv insgesamt	%	25	41,6	25	50

C. psitt=*Chlamydia psittaci*, *C. trach*=*Chlamydia trachomatis*, *C. suis*=*Chlamydia suis*, *Cp. psitt*=*Chlamydophila psittaci*, n=Probenanzahl, --- = keine Sequenzierung erfolgt

Tab. 22 PCR- und Sequenzierergebnisse der Gruppe II.

Tier		rechter Eileiter			linker Eileiter			Uterus
		A	I	UTV	A	I	UTV	
1	PCR	negativ	<i>C.trach</i>	negativ	negativ	negativ	<i>C.trach</i>	negativ
	Seq.	---	<i>C.suis</i>	---	---	---	---	---
2	PCR	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt</i> + <i>C.trach</i>
	Seq.	---	---	---	---	---	<i>Cp.abo</i>	---
3	PCR	negativ	negativ	<i>C.psitt</i>	negativ	negativ	negativ	negativ
	Seq.	---	---	---	---	---	---	---
4	PCR	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	<i>C.psitt</i>
	Seq.	---	---	---	---	---	---	---
5	PCR	negativ	<i>C.trach</i>	negativ	<i>C.psitt</i>	negativ	negativ	<i>C.psitt</i>
	Seq.	---	---	---	---	---	---	---
6	PCR	<i>C.trach</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
	Seq.	---	---	---	---	---	---	---
7	PCR	negativ	<i>C.psitt</i>	negativ	negativ	negativ	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt.</i> + <i>C.trach</i>
	Seq.	---	---	---	---	---	---	---
8	PCR	negativ	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt</i>	negativ	negativ	negativ
	Seq.	---	<i>Cp.psitt</i>	<i>Cp.psitt</i>	<i>Cp.psitt</i>	---	---	---
9	PCR	negativ	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt</i>	negativ
	Seq.	---	<i>Cp.psitt</i>	<i>Cp.psitt</i>	<i>Cp.psitt</i>	<i>Cp.psitt</i>	<i>Cp.psitt</i>	---
10	PCR	negativ	negativ	negativ	negativ	<i>C.psitt</i>	negativ	negativ
	Seq.	---	---	---	---	<i>Cp.psitt</i>	---	---
11	PCR	negativ	negativ	negativ	negativ	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt</i>	<i>C.trach</i>
	Seq.	---	---	---	---	<i>Cp.psitt</i>	<i>Cp.psitt</i>	<i>C.suis</i>
12	PCR	negativ	negativ	<i>C.psitt.</i> + <i>C.trach</i>	<i>C.psitt.</i>	negativ	negativ	<i>C.psitt.</i>
	Seq.	---	---	---	---	---	---	---
13	PCR	negativ	negativ	negativ	<i>C.psitt</i>	negativ	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt</i>
	Seq.	---	---	---	<i>Cp.psitt</i>	---	<i>Cp.psitt</i>	<i>Cp.psitt</i>
14	PCR	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	<i>C.trach</i>
	Seq.	---	---	---	---	---	---	<i>C.suis</i>
PCR								
positiv	n	1/14	5/14	4/14	5/14	3/14	5/14	8/14
insgesamt	%	7,1	35,7	28,6	35,7	21,4	35,7	57,1

C. psitt=*Chlamydia psittaci*, *C. trach*=*Chlamydia trachomatis*, *C. suis*=*Chlamydia suis*, *Cp. psitt*=*Chlamydophila psittaci*, *Cp. abo*=*Chlamydophila abortus*, A=Ampulle, I=Isthmus, UTV=uterotubale Verbindung, n=Probenanzahl, --- = keine Sequenzierung erfolgt

Tab. 23 PCR- und Sequenzierergebnisse der Gruppe III.

Nr.		rechter Eileiter			linker Eileiter			
		A	I	UTV	A	I	UTV	Uterus
1	PCR	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	<i>C.psitt</i>
	Seq.	---	---	---	---	---	---	<i>Cp.psitt</i>
2	PCR	negativ	negativ	negativ	negativ	<i>C.psitt</i>	negativ	negativ
	Seq.	---	---	---	---	<i>Cp.psitt</i>	---	---
3	PCR	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt+</i> <i>C.trach</i>	negativ	negativ	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt</i>
	Seq.	<i>Cp.abo</i>	<i>Cp.abo</i>	---	---	---	---	<i>Cp.abo</i>
4	PCR	<i>C.psitt</i>	<i>C.psitt</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	<i>C.psitt</i>
	Seq.	<i>Cp.psitt</i>	<i>Cp.psitt</i>	---	---	---	---	<i>Cp.psitt</i>
PCR	n	2/4	2/4	1/4	0/4	1/4	1/4	3/4
positiv insgesamt	%	50	50	25	0	25	25	75

C. psitt=*Chlamydia psittaci*, *C. trach*=*Chlamydia trachomatis*, *C. suis*=*Chlamydia suis*, *Cp. psitt*=*Chlamydophila psittaci*, *Cp. abo*=*Chlamydophila abortus*, n=Probenanzahl, A=Ampulle, I=Isthmus, UTV=uterotubale Verbindung, --- = keine Sequenzierung erfolgt

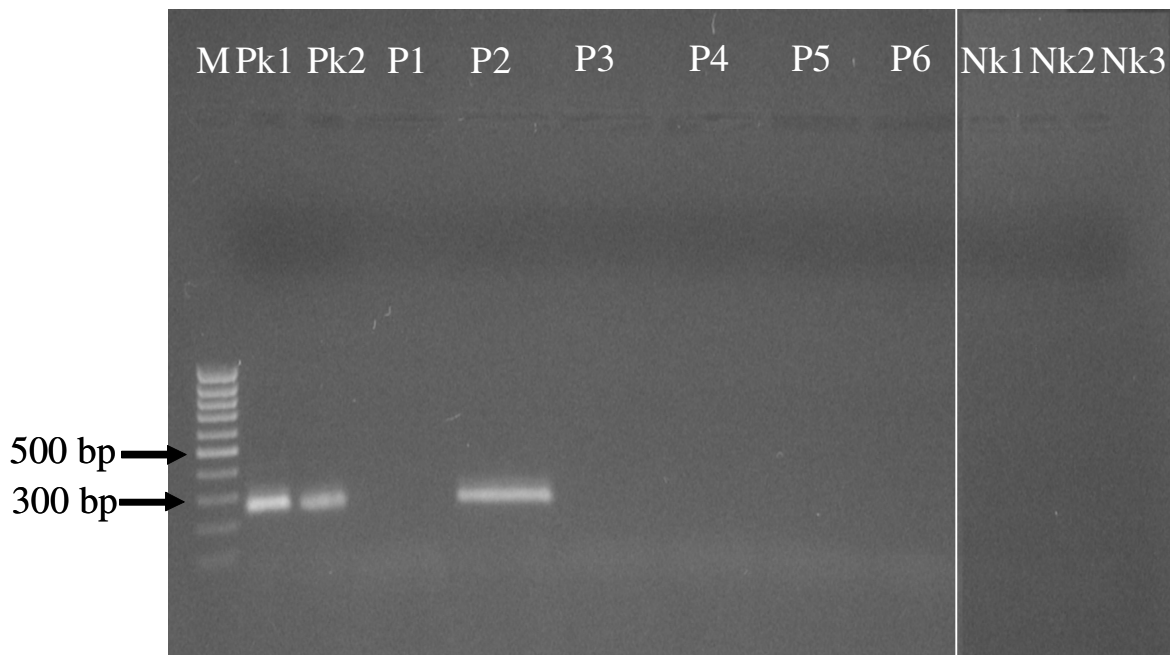


Abb. 12 Agarosegel nach dritter PCR (KALTENBOECK et al. 1997). In Probe 2 (P2), die aus dem Uterus einer reproduktionsgestörten Sau aus Gruppe II stammte, wurde *Chlamydia trachomatis* nachgewiesen. Belegung der Gelslots von links nach rechts: M = Molekulargewichtsmarker (100bp-Leiter), Pk1 = Positivkontrolle 1 (C8/DC24 10^3 Kopien), Pk2 = Positivkontrolle 2 (C8/DC24 10^1 Kopien), P1-P6 = Probe 1-6, Nk1-Nk3 = Negativkontrolle 1-3; bp = Basenpaare

Die Ergebnisse, die mit dem IFT und der PCR gewonnen wurden, differieren zum Teil erheblich. Verglichen wurden die Ergebnisse der Eileitersegmente und Uteri der Gruppen II und III (n=175). Übereinstimmende Resultate wurden in insgesamt 53,1 % (n=93) der Fälle erzielt (jeweils positiv: n=14; jeweils negativ: n = 79. In 14,3 % (n=25) der Fälle stimmten die positiven Ergebnisse der PCR nicht mit denen des IFT überein. In 32,6 % (n=57) der Fälle war es umgekehrt.

4.4 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

4.4.1 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Uteri

Insgesamt wurden die Genitalorgane von 38 Sauen der Gruppen I und II histologisch untersucht. In Tab. 24 sind die Ergebnisse der lichtmikroskopisch ermittelten Grade der endometrialen Durchblutung und Ödematisierung dargestellt. Zahlreiche Uteri waren hochgradig durchblutet (36,8%) und/oder ödematisiert (42,1%). Es bestand kein

Zusammenhang zwischen endometrialer Durchblutung und Ödematisierung zum Chlamydienbefund (PCR, IFT) oder Endometritisgrad.

Tab. 24 Grad der lichtmikroskopisch diagnostizierten endometrialen Ödematisierung und Durchblutung der Sauen (n=38) der Gruppen I und II

Score	Grad der endometrialen Ödematisierung		Grad der endometrialen Durchblutung	
	total <i>n</i>	Prozent %	total <i>n</i>	Prozent %
0	3	7,9	7	18,4
1	13	34,2	8	21,1
2	6	15,8	9	23,7
3	16	42,1	14	36,8

Die meisten Sauen (84,2%) der Gruppe I und II wiesen eine chronische Endometritis auf (Tab. 25). Nur ein Tier hatte eine akut-chronische Entzündung während der akute Typ bei keiner Sau zu beobachten war. Es bestand kein Zusammenhang zwischen Endometritis und sonstigen Befunden.

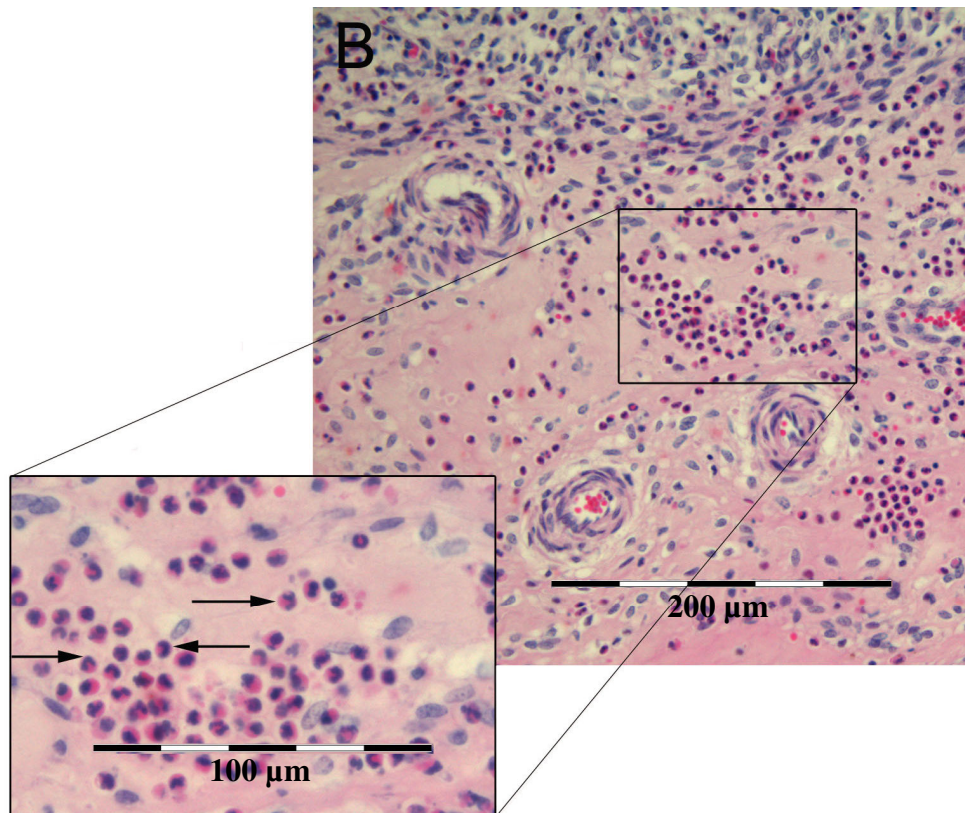
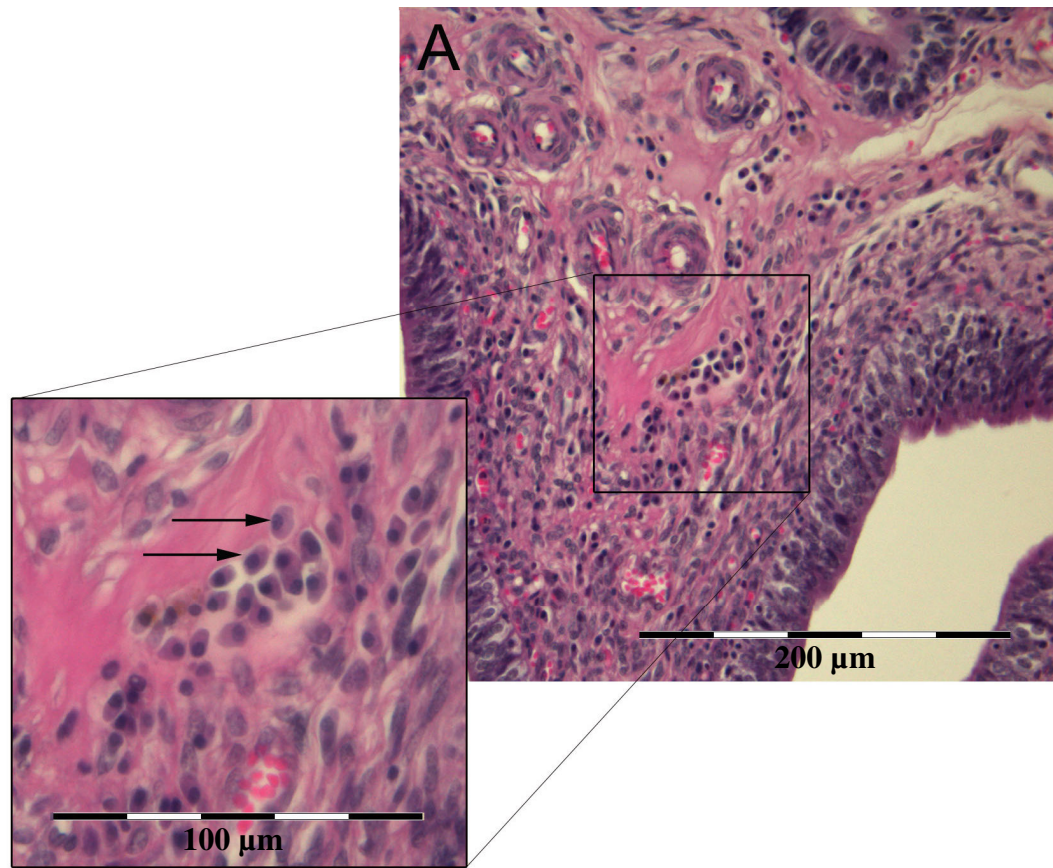
Tab. 25 Anteil Sauen mit mikroskopisch diagnostizierten Entzündungen des Endometriums (n=38)

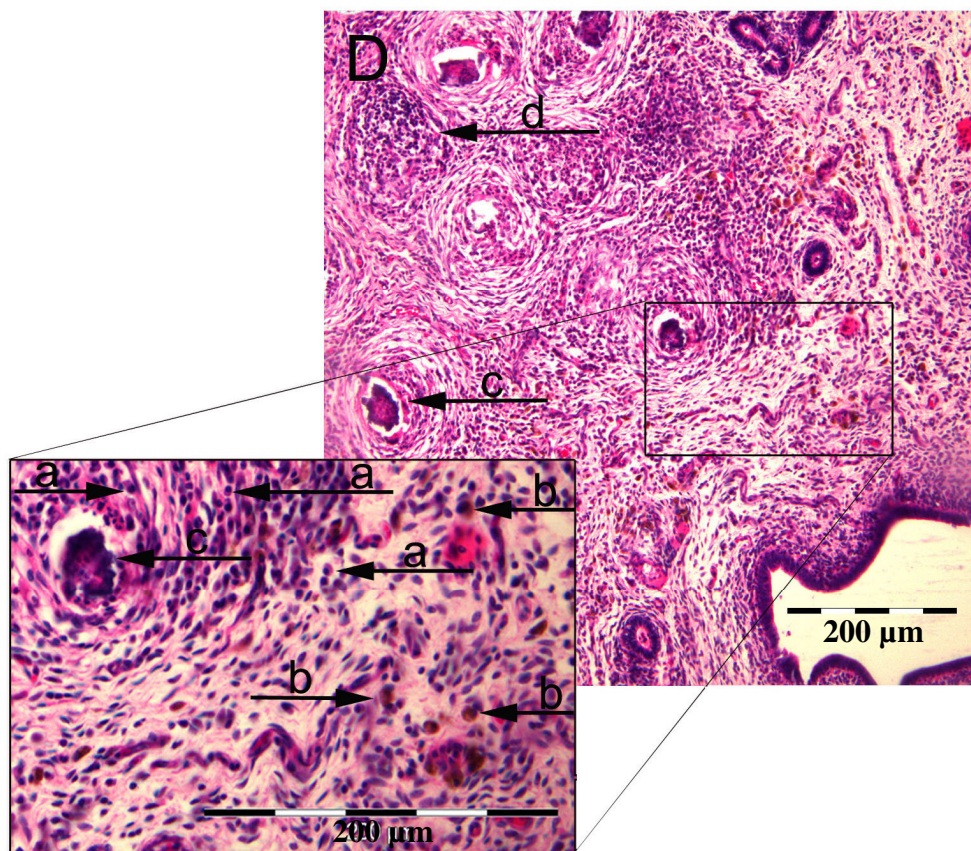
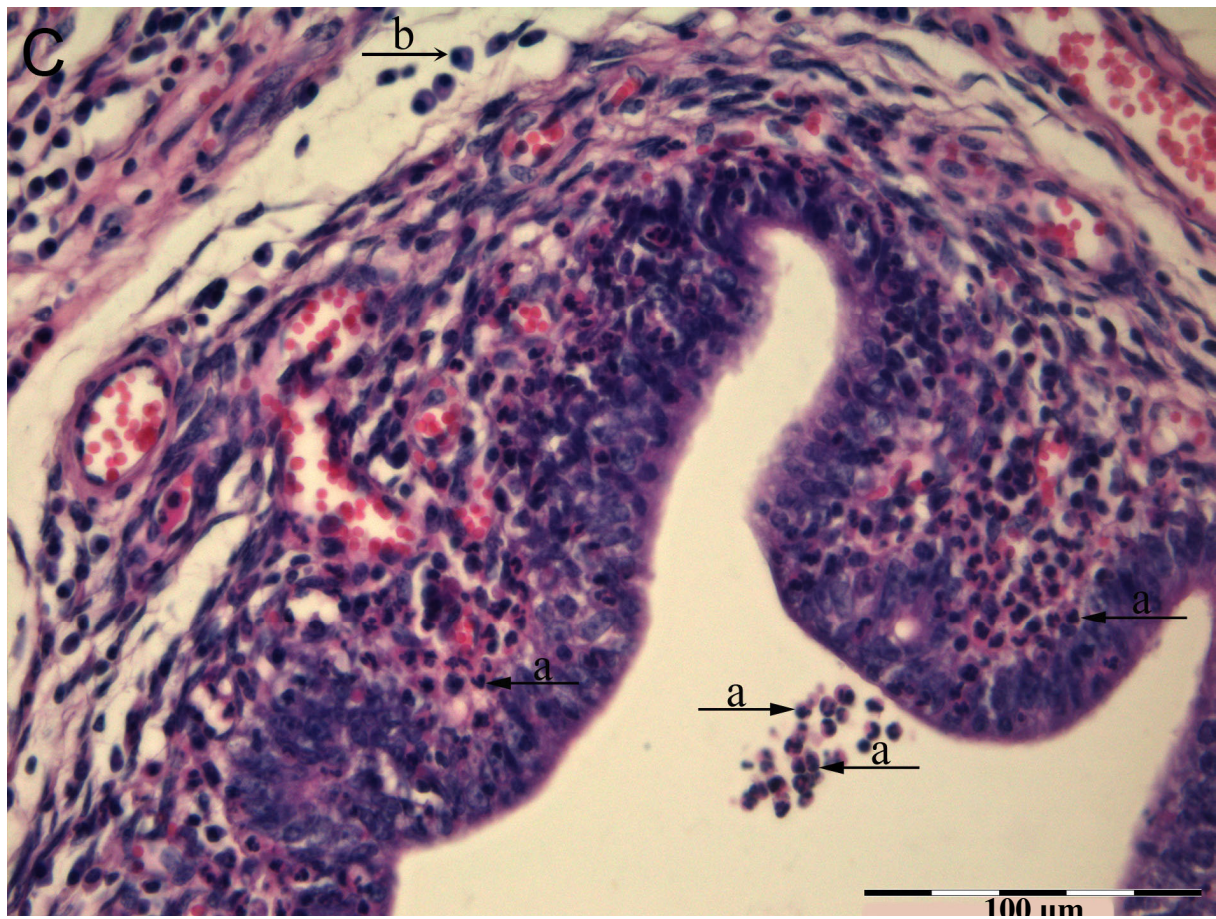
Ergebnis der histologischen Untersuchung	Anzahl der Tiere <i>n</i> (%)
ohne besonderen Befund	4 ^B (10,6)
akute Endometritis	0 ^C
akut-chronische Endometritis	1 ^{B,C} (2,6)
chronische Endometritis	32 ^A (84,2)
Sonderfall	1 ^{B,C} (2,6)

^{A-C} Werte unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$).

Die *Lamina propria mucosae* von 12 (31,6%) Uteri enthielt vermehrt eosinophile Granulozyten, ohne dass ein Zusammenhang zum Zearalenon-Befund bestand.

Typische histologische Befunde sind in Abbildung 13 dokumentiert.





- Abb. 13** Bild A: Chronische Endometritis; herdförmige Ansammlung von Plasmazellen im Stroma endometrialis
 Bild B: Massives Vorkommen von eosinophilen Granulozyten (Pfeile) im Stroma endometrialis
 Bild C: Akut-chronische Endometritis; massives Vorkommen von neutrophilen Granulozyten subepithelial und im Lumen (a-Pfeil), gleichzeitiges Auftreten von Plasmazellen im Stroma endometrialis (b-Pfeil)
 Bild D: Endometritissonderform; Detritusansammlungen (c-Pfeile) im Stroma endometrialis mit massivem Vorkommen von Plasmazellen (a-Pfeile), Hämosiderinablagerungen (b-Pfeile) und herdförmigen Lymphozytenansammlungen (Hintergrundbild, d-Pfeil)

4.4.2 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Eileiter

In den Tabellen 26–28 sind die Ergebnisse der mikroskopischen Beurteilung der tubalen Ödematisierung und Durchblutung sowie die jeweils beobachtete Anzahl Sekretvesikel dargestellt. Im Gegensatz zu den Uteri waren die Eileiter in allen Segmenten nur spärlich ödematisiert und durchblutet. Zwischen den Eileitersegmenten bestanden dahingehend keine Unterschiede.

Tab. 26 Grad der lichtmikroskopisch diagnostizierten Ödematisierung und Durchblutung der Eileitersegmente der Sauen der Gruppe I (n=19)

Score	Grad der Ödematisierung		Grad der Durchblutung	
	Ampulle	Isthmus	Ampulle	Isthmus
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
0	9 (47,4) ^b	13 (68,4) ^a	5 (26,3) ^B	16 (84,2) ^A
1	9 (47,4) ^a	5 (26,3) ^a	7 (36,8) ^A	2 (10,5) ^A
2	1 (5,2) ^a	1 (5,3) ^a	5 (26,3) ^A	0 (0) ^B
3	0 (0)	0 (0)	2 (10,6) ^A	1 (5,3) ^A

0=kaum nachweisbar, 1=geringgradige, 2=mittelgradige, 3=hochgradige Ödematisierung

Grad der Ödematisierung: ^{a,b} Werte in Zeilen unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$).

Grad der Durchblutung: ^{A,B} Werte in Zeilen unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$).

Tab. 27 Grad der lichtmikroskopisch diagnostizierten Ödematisierung und Durchblutung der Eileitersegmente der Sauen der Gruppe II (n=21)

Score	Grad der Ödematisierung				Grad der Durchblutung			
	AR	AL	IR	IL	AR	AL	IR	IL
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
0	12 (57,1)	11 (52,3)	14 (66,6)	15 (71,4)	10 (47,6) ^B	10 (47,6) ^B	16 (76,2) ^{A,B}	19 (90,4) ^A
1	7 (33,3)	5 (23,8)	6 (28,6)	4 (19,0)	6 (28,6) ^A	7 (33,4) ^A	3 (14,2) ^{A,B}	0 (0) ^B
2	1 (4,8)	4 (19,1)	1 (4,8)	1 (4,8)	3 (14,3) ^A	2 (9,5) ^A	1 (4,8) ^A	1 (4,8) ^A
3	1 (4,8)	1 (4,8)	0 (0)	1 (4,8)	2 (9,5) ^A	2 (9,5) ^A	1 (4,8) ^A	1 (4,8) ^A

0 = keine, 1 = geringgradige, 2 = mittelgradige, 3 = hochgradige Ödematisierung;

AR=Ampulle rechts, AL=Ampulle links, IR=Isthmus rechts, IL=Isthmus links;

Grad der Ödematisierung: Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Grad der Durchblutung: ^{A,B} Werte in Zeilen unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$).

Tab. 28 Grad der lichtmikroskopisch diagnostizierten Ödematisierung und Durchblutung der Eileitersegmente der Sauen der Gruppe III (n=8)

Score	Grad der Ödematisierung				Grad der Durchblutung			
	AR	AL	IR	IL	AR	AL	IR	IL
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
0	3 (37,5) ^b	4 (50,0) ^{a,b}	6 (75,0) ^{a,b}	7 (87,5) ^a	5 (62,5)	6 (75,0)	8 (100)	8 (100)
1	3 (37,5) ^a	1 (12,5) ^a	2 (25,0) ^a	1 (12,5) ^a	1 (12,5)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)
2	2 (25,0) ^a	2 (25,0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	2 (25,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3	0 (0) ^a	1 (12,5) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)

0=keine, 1=geringgradige, 2=mittelgradige, 3=hochgradige Ödematisierung; AR=Ampulle rechts, AL=Ampulle links, IR=Isthmus rechts, IL=Isthmus links;

Grad der Ödematisierung: ^{a,b} Werte in Zeilen unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$).

Grad der Durchblutung: Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Die Sauen der Gruppen I und II unterschieden sich in der Anzahl der Sekretvesikel. Tendenziell war zu erkennen, dass in den Ampullensegmenten die Grade „viele, regelmäßig verteilte Sekretvesikel“ (Ampullen n=22; Isthmen n=8) bis „massenhaft Sekretvesikel, fokale Zottenverklebungen“ (Ampullen n=16; Isthmen n=4) häufiger vorkamen. Dagegen konnten die Grade „vereinzelt Sekretvesikel“ (Ampullen n=6; Isthmen n=30) und „wenige, regelmäßig verteilte Sekretvesikel“ (Ampullen n=17; Isthmen n=19) häufiger in den Isthmussegmenten vergeben werden. Diese Tendenz war auch in Gruppe III zu erkennen (Ampullensegmente: „vereinzelt Sekretvesikel“ n=1, „wenige, regelmäßig verteilte Sekretvesikel“ n=6, „viele,

regelmäßig verteilte Sekretvesikel“ n=5, „massenhaft Sekretvesikel, fokale Zottenverklebungen“ n=5; Isthmussegmente: „vereinzelt Sekretvesikel“ n=14, „wenige, regelmäßig verteilte Sekretvesikel“ n=1, „viele, regelmäßig verteilte Sekretvesikel“ n=0, „massenhaft Sekretvesikel, fokale Zottenverklebungen“ n=0).

Insgesamt wiesen 24 (60%) der Sauen der Gruppen I und II krankhaft veränderte Eileiter auf. Insgesamt 24 Ampullen bzw. 10 Isthmen waren betroffen. Sauen der Gruppe II wiesen entweder ein- (n=2) oder beidseitige (n=6) Veränderungen auf. Krankhafte Veränderungen basierten vor allem auf einer erhöhten Anzahl an Immunzellen, die diffus im Epithel des Eileiters verteilt waren. Überwiegend wurden vermehrt Lymphozyten (n=29) gefunden, während gemischtzellige Infiltrationen mit Lymphozyten und Plasmazellen (n=3) nur seltener zu beobachten waren. Vermehrt Plasmazellen sowie eine erhöhte Anzahl Lymphozyten und eosinophile Granulozyten wurden in jeweils einem Fall beobachtet. Daneben waren auch fokale Ansammlungen von Lymphozyten und Plasmazellen zu beobachten (n=5). Drei Eileiterabschnitte wiesen ausschließlich vermehrt eosinophile Granulozyten auf. Sie blieben bei der Beurteilung als „intakt“ oder „krankhaft verändert“ unberücksichtigt.

In der Gruppe der trächtigen Tiere konnten ebenfalls Eileiter gefunden werden (n=4; 50%), die als „krankhaft verändert“ zu beurteilen waren. Bei drei Tieren war ein Eileiter, bei einem weiteren Tier beide Eileiter betroffen.

Sonstige Eileiterbefunde wurden vor allem in der Eileiterampulle der Sauen der Gruppen I und II beobachtet. Sie sind nachfolgend genannt: Zottenatrophie/Stummelzotten (n=1), Bindegewebszubildung (n=2), vermehrt Detritus im Lumen (n=1), Bindegewebszubildung und vermehrt Detritus im Lumen (n=1). Ein Isthmus enthielt vermehrt Detritus. Die Ampullen tragender Tiere waren gänzlich frei jeglicher histologischer Besonderheiten. Ein Isthmus enthielt vermehrt Detritus im Lumen.

In vier Ampullen und drei Isthmen reproduktionsgestörter Sauen wurden intraepitheliale Zysten festgestellt. Die Anzahl pro Präparat variierte zwischen 1 und 7. Fünf Isthmen tragender Tiere wiesen eine bis sieben intraepitheliale Zysten auf, während die Ampullen keine derartigen Zysten enthielten.

Typische histologische Bilder des Eileiters sind in der Abbildung 14 dargestellt.

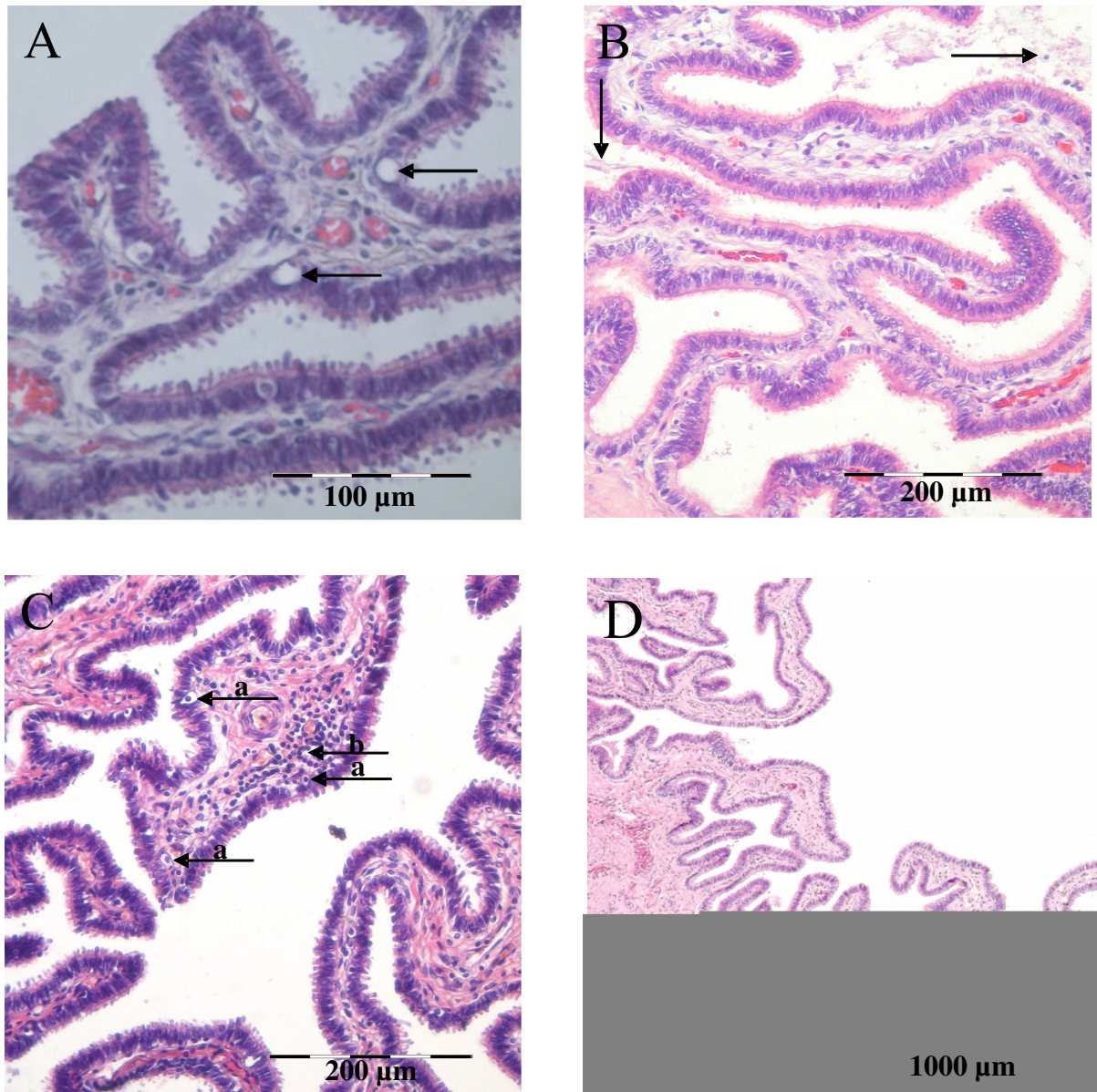


Abb. 14 Typische histopathologische Veränderungen im Eileiter
 Bild A: Ampulle mit intraepithelialen Zysten (schwarze Pfeile)
 Bild B: Ampulle mit massenhaften Sekretansammlungen (schwarze Pfeile) zwischen den Schleimhautfalten
 Bild C: Ampulle mit erhöhter Anzahl Lymphozyten (b-Pfeil), intraepitheliale Lymphozyten (a-Pfeile)
 Bild D: Isthmus mit Zottenatrophie / Stummelzotten

4.5 Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung wurden in 6 Scores eingeteilt. Dabei wurden die detektierten Mikroorganismen in ihrer Pathogenität und in ihrer Anzahl berücksichtigt. Die meisten (68,2%) der 41 untersuchten Uteri wiesen eine fakultative bis obligat pathogene Bakterienflora auf, während nur bei 9,8% der Sauen eine physiologische Flora diagnostiziert werden konnte (Abb.15). Die Befunde eines Tieres wurden nicht berücksichtigt, da eine Kontamination durch nicht sachgerechten Versand nicht auszuschließen war.

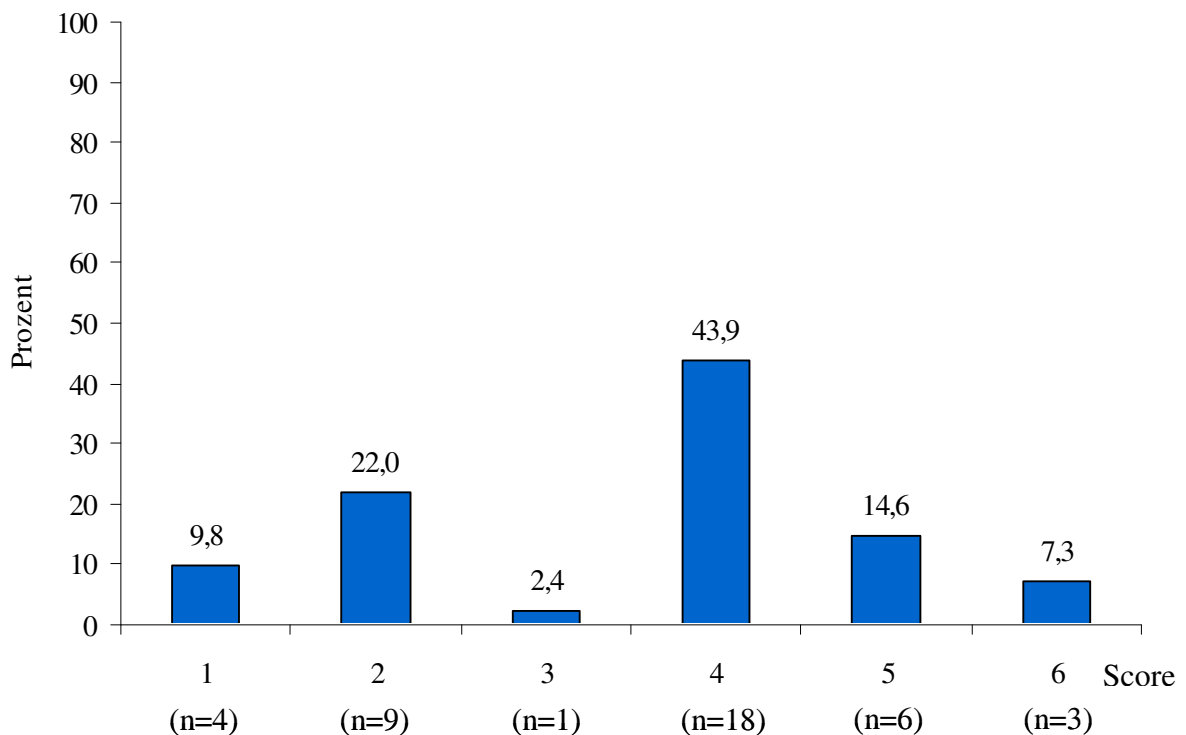


Abb. 15 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung des Uterus. Es ist die prozentuale Häufigkeit der Sauen der Gruppen I und II (n=41) je Score dargestellt. Die Scores werden wie folgt definiert: Score 1 physiologische Flora bzw. Normalflora; Score 2 potenzielle Kontamination, Anreicherungsverfahren; Score 3 geringgradig fakultativ pathogene Flora; Score 4 mittelgradig fakultativ pathogene Flora bzw. geringgradig obligat pathogene Flora; Score 5 hochgradig fakultativ pathogene Flora bzw. mittelgradig obligat pathogene Flora; Score 6 hochgradig obligat pathogene Flora.

Tabelle 29 gibt die bei den Tieren der Gruppen I und II diagnostizierten Bakterien in der Häufigkeit ihres Nachweises wieder. Aus der Gruppe der als obligat pathogen beurteilten Bakterien wurde am häufigsten *E. coli* (41%) und *Staphylococcus intermedius* (8,2%)

nachgewiesen. In keinem der untersuchten Uteri konnten Pilze oder Hefen nachgewiesen werden.

Tab. 29 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen der Uteri der Sauen der Gruppen I und II (n=41) ¹

Mikroorganismus	Total	Häufigkeit des Nachweises	
		im Direktausstrich	im AV
	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
<i>Escherichia coli</i>	32	23	9
aerobe Sporenbildner	11	10	1
<i>Staphylococcus intermedius</i>	5	4	1
vergrünende Streptokokken	5	0	5
Mikrokokken	4	3	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	2	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	1	0
coliforme Keime	1	1	0
<i>Klebsiella sp.</i>	1	1	0
Streptokokken ohne Zuordnung zu Lancefieldgruppen	1	1	0
<i>Staphylococcus dysgalactiae spp. equisimilis</i>	1	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	1
Enterokokken	1	0	1
Sarcinen	1	1	0

AV = Anreicherungsverfahren

¹ Es konnten keine Hefen und Pilze nachgewiesen werden.

4.6 Ergebnisse der mykotoxikologischen Untersuchungen

Bei 21 (77,8%) der 27 untersuchten Galleproben der Sauen der Gruppen 1 und 2 wurde Zearalenon in einer Konzentration von ≥ 50 ng/ml festgestellt ($p \leq 0,05$). Es bestanden keine Zusammenhänge zwischen dem Zearalenonbefund und sonstigen Ergebnissen dieser Studie.

5 Diskussion

Weltweit können Chlamydieninfektionen vielfältige Krankheitserscheinungen bei Mensch und Tier hervorrufen. In der Humanmedizin zählen Chlamydien zu den am häufigsten venerisch übertragenen Bakterien. Sie sind eine der wesentlichsten Ursache für die infektiös bedingte Sterilität der Frau. Als Erreger der genitalen Chlamydiose wurden die Serovare D-K von *Chlamydia trachomatis* identifiziert. Nach genitaler Infektion können die Chlamydien über den Uterus in die Eileiter ascendieren, wo sie neben dem Oberflächenepithel auch die glatte Muskulatur schädigen können. Strukturelle Alteration, Adhäsionen und Obstruktionen sind das finale morphologische Resultat und in der Regel Ursache tubaler Sterilität (GONZALES et al. 2004). Die Infektion verläuft häufig symptomlos. Frauen sind sich ihrer Erkrankung nicht bewusst, unterlassen die medizinische Konsultation und werden nicht behandelt. (PAAVONEN u. EGGERT-KRUSE 1999).

Im Zusammenhang mit Chlamydien wurde beim Schwein eine Vielzahl von klinischen Erkrankungen beschrieben. Genitale Infektionen kommen sowohl beim weiblichen wie auch männlichen Tier vor (SCHILLER et al. 1997, BUSCH et al. 2000, CAMENISCH et al. 2004, HOTZEL et al. 2004, KAUFFOLD et al. 2006). Bei Sauen gelten Aborte (SCHILLER et al. 1997, SHERBAN et al. 1972, 1978, THOMA et al. 1997), Mumifikation von Feten (DANIELS et al. 1994), perinatale Mortalität (WOLLEN et al. 1990), Endometritis (BUSCH et al. 2000, LONGBOTTOM 2004, POSPISCHIL 2004), Vaginalausfluss (EGGEMANN et al. 2000) und wiederholtes Umrauschen (WITTENBRINK 1991b, CAMENISCH et al. 2004) zu Erkrankungen bzw. Phänomenen, die durch Chlamydien verursacht werden. Chlamydien wurden wiederholt in Uteri und Zervixutepfern vor allem reproduktionsgestörter Sauen nachgewiesen (EGGEMANN et al. 2000, HOELZLE et al. 2000). Im Gegensatz zum Uterus wurden Eileiter nur sporadisch untersucht und waren nur in Ausnahmefällen Chlamydien-positiv (BUSCH et al. 2000, CAMENISCH et al. 2004). Ob Infektionen des Eileiters von Schweinen zudem zu solchen Alterationen führen, wie aus der Humanmedizin von der Frau bekannt, wurde bisher noch nicht untersucht.

Ziel der Arbeit war deshalb, eine repräsentative Anzahl reproduktionsgestörter Sauen auf Chlamydien im Eileiter und Uterus zu untersuchen. Die Untersuchungen sollten Angaben zur Prävalenz chlamydialer Infektionen der Genitalien, vor allem aber des Eileiters des Schweins

liefern. Die gleichzeitige Untersuchung tragender Sauen in entsprechenden Organen sollte gewährleisten, die klinisch relevante Bedeutung genitaler Chlamydien für die Fertilität einzuschätzen. Histologische Untersuchungen von Eileiter und Uterus sollten zeigen, ob durch Chlamydien lichtmikroskopisch erfassbare Alterationen verursacht werden. Bakteriologische und mykotoxikologische Untersuchungen repräsentativen Organ- und Substratmaterials dienen der differenzialdiagnostischen Abklärung. Die Arbeit sollte dazu beitragen, besser zu bewerten, welche Bedeutung Chlamydien als Verursacher von Fruchtbarkeitsstörungen bei Sauen haben.

5.1 Vergleich von Polymerase-Kettenreaktion und Immunfluoreszenztest

IFT und PCR lieferten zum Teil erheblich divergente Resultate. Nur 8 % bzw. 45,1 % der mit dem IFT als positiv bzw. negativ diagnostizierten Uteri bzw. Eileitersegmente der Gruppen II und III wurden auch in der PCR als positiv bzw. negativ beurteilt. Diese Divergenz kann nur durch die gänzlich unterschiedlichen Mechanismen des Nachweises begründet sein und wird eines der beiden Verfahren zwangsläufig als eher ungeeignet kompromittieren.

Der IFT basiert auf der Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes. Ein mit Farbstoff markierter monoklonaler Antikörper bindet an Chlamydien-spezifisches LPS. Die PCR hingegen beruht auf dem Nachweis Chlamydien-spezifischer DNA (KALTENBOECK et al. 1997). Die DNA wird nur dann amplifiziert und für den Untersucher sichtbar, wenn Primer an einen chlamydien-spezifischen, komplementären DNA-Abschnitt binden können. Besteht keine Übereinstimmung in der Nukleinsäuresequenz, kann der Primer nicht binden; die Amplifikation bleibt aus. Während die im IFT verwendeten Antikörper unspezifisch binden können, zum Beispiel an LPS anderer gramnegativer Bakterien, und dadurch falsch positive Resultate generiert werden, ist derartiges in der PCR nahezu ausgeschlossen. Die PCR ist hingegen anfällig gegenüber Kontamination (d. h. fremd eingebrachte DNA). Werden Kontaminaten amplifiziert und als positive Resultate ausgewiesen, entstehen auch mit der PCR falsch positive Resultate. Dieser Gefahr begegnet man, wie auch in dieser Studie, unter anderem mit der Etablierung von Negativkontrollen. Bei keinem der in dieser Studie mithilfe der PCR generierten Ergebnisse waren zeitgleich Negativkontrollen positiv, so dass falsch positive Resultate unwahrscheinlich sind. Allein deshalb ist zu vermuten, dass falsch positive Resultate eher mit dem IFT, weniger oder nicht mit der PCR generiert wurden. Letzteres findet dadurch Bestätigung, dass positive Amplifikate sequenziert und als Chlamydien identifiziert wurden. Ob falsch negative Resultate auftraten, bleibt spekulativ. Da fast alle

untersuchten Gewebe im IFT positiv waren, sind falsch negative Ergebnisse eher unwahrscheinlich. Molekularbiologische Verfahren, die auf der Anwendung von Enzymen wie der Polymerase basieren, können durch geeignete Inhibitoren gestört werden. Derartiges ist auch in dieser Studie nicht auszuschließen, als wesentliche Fehlerquelle aber eher unwahrscheinlich. Ausgehend von genannten Überlegungen ist anzunehmen, dass die in dieser Studie mit der PCR generierten Ergebnisse die „wahre“ Prävalenz chlamydialer Infektionen des weiblichen Genitale widerspiegeln und die des IFT eher fehlerhaft sind. Da die PCR ähnlich schnell durchführbar, sensitiv und preiswert ist, ist sie zum Nachweis von Chlamydien in Studien jeglicher Fragestellungen besser als der IFT geeignet. Dieser Schlussfolgerung scheinen schon vordem andere und mittlerweile die meisten Untersuchungsinstitutionen gefolgt zu sein (SACHSE u. GROSSMANN 2002).

5.2 Prävalenz und Bedeutung

Die Sauenpopulation Europas scheint endemisch mit Chlamydien durchseucht (EGGEMANN et al. 2000, VANROMPAY et al. 2004). EGGEMANN et al. (2000) ermittelten Seroprävalenzen in deutschen Ferkelerzeugerbetrieben von 4,3% bis 72,7%. Ähnlich hohe Prävalenzen sind aus Belgien (VANROMPAY et al. 2004) und Litauen (BAGDONAS et al. 2005) bekannt und gleichermaßen in der Eberpopulation zu finden (KAUFFOLD et al. 2006). Da Antikörper auch dann gebildet werden, wenn Infektionen anderer Organsysteme, wie Darm oder Lunge, erfolgen, sind positive serologische Befunde nicht zwangsläufig Indikator für eine genitale Infektion (VANROMPAY et al. 2004). Andererseits sind Tiere mit positivem Befund in der PCR nicht zwangsläufig serologisch positiv, da 1) keine systemische Immunantwort erfolgte, 2) eine Immunantwort erfolgte, jedoch Monate zurückliegt und keine Antikörper mehr vorhanden sind oder 3) eine persistierende Infektion vorliegt. Gleiche Beobachtungen respektive Überlegungen wurden bei anderen Tierarten wie dem Rind gemacht (WITTENBRINK et al. 1993). Unabhängig davon ist auffällig, dass die Seroprävalenz in etwa der entspricht, die bei Analyse von Materialien aus Genitalorganen von Sauen zu ermitteln war (HOELZLE et al. 2000, EGGEMANN et al. 2000). Es ist zu vermuten, dass die jeweils detektierten Antikörper zu einem nicht unerheblichen Teil Resultat der Immunantwort nach genitaler Infektion sind. Folgt man dieser Argumentation (Seroprävalenz \approx Prävalenz in Genitalorganen), erstaunt es nicht, dass in 14 (33,3 %) der untersuchten Uteri Chlamydien nachgewiesen werden konnten. Die Ergebnisse harmonisieren ferner mit denen anderer früherer Arbeiten. So detektierten CAMENISCH et al. (2004) bei

sechs (28,6 %) von 21 reproduktionsgestörten Sauen Chlamydien in Uteri. BANGE (2000) wies mittels IFT bei 60,3 % von 242 untersuchten Tieren Chlamydien im Uterus nach. Obwohl BUSCH et al. (2000), im Gegensatz zu obigen Autoren nur bei einer von 91 Sauen Chlamydien im Uterus beobachteten, sollte konstatiert werden, dass Chlamydien im Uterus einer nicht unerheblichen Anzahl reproduktionsgestörter Sauen vorkommen und allein deshalb vermutlich klinisch relevant sind.

Mit dieser Arbeit gelang es erstmalig, bei einer größeren Anzahl reproduktionsgestörter Sauen Chlamydien im Eileiter nachzuweisen. Die tubale Präsenz an sich wurde schon bei CAMENISCH et al. (2004) beschrieben, die bei einer von 21 Sauen Chlamydien im Eileiter nachwiesen. Welche Bedeutung Chlamydien im Eileiter des Schweins haben, kann auch anhand der Ergebnisse dieser Studie nicht gänzlich geklärt werden. Auch wenn keine Korrelation zwischen histologischen Befunden (d.h. Inflammation ja/nein) und Chlamydia-positivem Befund bestand, ist nicht auszuschließen, dass die eine oder andere lichtmikroskopisch nachweisbare morphologische Alteration durch Chlamydien verursacht wurde. Deren prinzipielle Fähigkeit, Entzündungen und strukturelle Schäden im Eileiter hervorzurufen, ist hinlänglich bekannt und wurde nach natürlicher oder artifizieller Infektion bei zahlreichen Spezies einschließlich Mensch (LUCISANO et al. 1992, STERN et al. 1996), Primat (VAN VOORHIS et al. 1997), Labortieren (KHAMESIPOUR et al. 1994, TUFFREY et al. 1994, RANK et al. 2000) und der Stute (MEDENBACH et al. 1999) gezeigt. Interessant ist in diesem Zusammenhang eine neuere Studie von VANROMPAY et al. (2006), die fünf Jungsaugen mit dem genitopathogenen Stamm 468 von *Chlamydia trachomatis* intrazervikal inokulierten und sowohl im Uterus als auch Eileiter entzündliche Reaktionen und strukturelle Schäden beobachteten. Neben derartigen architektonischen Schäden sind subtile morphologische und/oder funktionelle Alterationen des Tubenepithels und/oder der Eileitermuskulatur denkbar. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der humanen, mit Chlamydien infizierten Salpinx demonstrierten zum Teil verheerende Veränderungen, die sich unter anderem in partiellem, bisweilen totalem Zilienverlust, Hypersekretion mit Verklebungen der Zilien und Epithelzelldefekten manifestierten (LENG et al. 1998). Ähnliches ist von Primaten und Labortieren bekannt, die künstlich infiziert wurden (PATTON et al. 1989, RANK u. SANDERS 1992, TUFFREY et al. 1994, VAN VOORHIS et al. 1997). Es versteht sich von selbst, dass derart geschädigte Tuben ihrer physiologischen Funktion – Aufnahme und Transport der Eizelle, Ort der Fertilisation, Transport von Spermien und Embryo u.a. – nicht adäquat nachkommen können. Bedenkt man sonstige Funktionen des

Eileiters (Ernährung der Gameten und des frühen Embryos, Regulation von Reifungs-, Differenzierungs- und Wachstumsprozessen) und die enorme Sekretionsleistung (nutritive Substanzen, Wachstumsfaktoren u.a.), wird plausibel, dass eine wenn auch nur geringfügige Störung zum Beispiel durch eine Infektion mit Chlamydien fatale Folgen haben kann. Als Beispiel sei HSP60 genannt, das bei der Interaktion zwischen Samen- und Eileiterzelle im Bereich des Isthmus Bedeutung besitzt (NIXON et al. 2005). Chlamydien wurden auch im Isthmus nachgewiesen und HSP60 von der infizierten Wirtzelle überexprimiert (LYONS et al. 2006).

Von den 14 Tieren mit Chlamydien im Uterus wiesen 50% synchron Chlamydien in einem oder beiden Eileitern auf. (BARLOW et al. 2001). Dieser Befund ist nicht verwunderlich, da anzunehmen ist, dass die Chlamydien nach genitaler Infektion über Zervix und Uterus in die Eileiter gelangen. Eine derartige ascendierende Kolonialisierung wurde bei zahlreichen Spezies (Mensch: LUCISANO et al. 1992; Meerschweinchen: RANK et al. 2000) experimentell reproduziert und ist der Infektionsweg, auf dem die Besiedlung der Tuben der Frau basiert. Da Sauen zum Teil selektiv im Uterus oder im Eileiter positiv waren, muss eine oben beschriebene ascendierende Infektion nicht immer erfolgt sein. Divergierende Befunde aus Uterus und Eileiter sind auch aus der Humanmedizin bekannt (LUCISANO et al. 1992). Alternative Begründungen umfassen 1) die Persistenz von Chlamydien in dem einen oder anderen Organ und 2) fehlerhafter Nachweis. So ist es nicht gänzlich ausgeschlossen, dass Organabschnitte der Untersuchung zugeführt wurden, die keine Chlamydien aufwiesen, obwohl das Organ an sich Antigen enthielt. Experimentell konnte *in vitro* demonstriert werden, dass *Chlamydia suis* schwach invasiv ist und nur jede 10. Uteruszelle infiziert (VANROMPAY et al. 2004).

In dieser Arbeit wurden Uteri und Eileiter von acht tragenden Sauen untersucht. Sie galten als Kontrolltiere. Es sollte eruiert werden, ob auch tragende Tiere genitale Chlamydien besitzen, um zu eruieren, welche Bedeutung Chlamydien für das Infertilitätsgeschehen bei der Sau besitzen. Interessant war, dass Chlamydien auch bei den tragenden Sauen gefunden wurden: vier (50 %) der acht untersuchten Tiere wiesen Chlamydien im Eileiter / Uterus auf. Eine gleichzeitige Infektion von Eileiter und Uterus lag bei zwei (25 %) Tieren vor, jeweils bei einem Tier konnten Chlamydien ausschließlich im Eileiter bzw. Uterus detektiert werden. Die alleinige Präsenz von Chlamydien im Genitale der Sau bedeutet offensichtlich nicht, dass eine Infektion vorliegen muss und Genitalorgane fertilitätsgeschädigt sind. Ähnliches ist aus der

Humanmedizin bekannt (BARLOW et al. 2001). Die Ursachen dafür sind spekulativ, eine Persistenz des Erregers selektiv im Eileiter denkbar.

Letztlich bietet auch die Veterinärmedizin eine Fülle ähnlicher Befunde, sodass die alleinige Präsenz von Antigen nicht automatisch eine Erkrankung bedeutet. So waren in den Studien von EGGEMANN et al. (2000) und HOELZLE et al. (2000) auch reproduktionsgesunde Sauen in Zervixtupfern positiv. Dass Chlamydien z.B. häufiger bei reproduktionsgestörten Rindern als bei gynäkologisch unbeanstandeten zu finden waren (CAVIRANI et al. 2001, WEHREND et al. 2005), suggeriert, dass auch gesunde Individuen Chlamydien beherbergen. Die genitale Chlamydiose (d.h. eine durch eine Chlamydieninfektion ausgelöste Fertilitätsstörung) ist offensichtlich an andere, zusätzliche Faktoren gebunden und – wie auch beim Rind postuliert (WEHREND et al., 2005; KALTENBOECK et al. 2005) – als Faktorenerkrankung anzusehen. Welche Faktoren im Einzelnen notwendig sind oder ausreichen, dass aus einer simplen Besiedlung krankhafte Veränderungen resultieren, ist unklar. Überbelegung (KALTENBOECK et al. 2005) und Stoffwechselentgleisungen (Ketose; WEHREND et al. 2005) wurden für das Rind genannt. Ähnliches mag beim Schwein zutreffen. Letztendlich darf nicht vergessen werden, dass auch beim Schwein unterschiedliche Spezies vorkommen, die in ihrer Virulenz variieren. Ähnliche Überlegungen zur Pathogenese der humanen Chlamydien-bedingten Salpingitis sind dem Übersichtsreferat von DEBATTISTA et al. (2003) zu entnehmen.

5.3 Chlamydienpezies

In der vorliegenden Arbeit wurden die Amplifikate der dreistufigen PCR nach KALTENBOECK et al. (1997) sequenziert. Sinn war, die Sequenzen mit denen der Datenbank des National Center of Biotechnology Information (BLAST) zu vergleichen und anhand von Sequenzhomologien auf die Chlamydienpezies gemäß neuer Taxonomie zu schließen (EVERETT et al. 1999). Insgesamt wurden 33 positive PCR-Amplifikate aus Eileitersegmenten und Uteri von 26 reproduktionsgestörten Tieren der Gruppen I und II sequenziert. Am häufigsten wurden *Chlamydophila psittaci* (n = 18) und *Chlamydia suis* (n = 10) detektiert. Seltener waren *Chlamydophila abortus* (n = 2) und *Chlamydia trachomatis* (n = 3) in den Genitalorganen reproduktionsgestörter Sauen festzustellen. Die Ergebnisse erstaunen insgesamt. Zum einen, da *Chlamydophila psittaci* (d.h. der aviäre Stamm von *Chlamydia psittaci*, nach alter Taxonomie), nicht aber *Chlamydophila abortus* (d.h. der Wiederkäuer-Stamm von *Chlamydia psittaci*, nach alter Taxonomie) die dominierende

Spezies war. In fast allen bisherigen Studien wurde Letzterer in Genitalorganen beim Schwein detektiert (SCHILLER et al. 1997a, EGGEMANN et al. 2000, HOELZLE et al. 2000). Die häufige Detektion von *Chlamydophila psittaci* in dieser Studie suggeriert, dass diese Spezies genitoaffin beim Schwein ist und möglicherweise reproduktionsphysiologische Prozesse beeinträchtigt. Der Nachweis an sich ist nicht erstmalig, da *Chlamydophila psittaci* schon vormals wenn auch sporadisch beim Schwein zu beobachten war (BUSCH et al. 2000, HOTZEL et al. 2004, VANROMPAY et al. 2004). Die Häufigkeit des Nachweises in dieser Studie konterkariert die Vermutung von SCHILLER et al. (1997), dass *Chlamydophila psittaci* eine Kontaminate ist. Der Nachweis von *Chlamydophila psittaci* im Sperma von Ebern (KAUFFOLD et al. 2006, TEANKUM et al. 2006) lässt darüber hinaus vermuten, dass diese Spezies venerisch mit dem Sperma auf die Sau übertragen wird. Die Ergebnisse erstaunen ferner, da erstmals eine bisher nur beim Menschen gefundene Spezies, nämlich *Chlamydia trachomatis*, beim Schwein detektiert wurde. Da keine weitere Typisierung erfolgte, ist nicht klar, ob es sich dabei um eines der genitopathogenen Serovare D – K handelte. Unabhängig davon ist der Nachweis an sich schon bedenklich, da *Chlamydia trachomatis* als Zoonoseerreger zu betrachten ist. Dass Schweine prinzipiell *Chlamydia trachomatis* beherbergen können, wird aus der schon oben zitierten Studie von VANROMPAY et al. (2004) deutlich. Weitere Studien sollten sich dieser Thematik widmen. Im Gegensatz zu *Chlamydia trachomatis* ist die Detektion von *Chlamydia suis* und *Chlamydophila abortus* im Genitaltrakt des Schweins nicht verwunderlich, da beide Spezies schon wiederholt vormals nachgewiesen wurden (SCHILLER et al. 1997, EGGEMANN et al. 2000, HOELZLE et al. 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass Schweine natürliche Wirte für *Chlamydia suis* und *Chlamydophila abortus* darstellen.

Die Ergebnisse der Sequenzierung der Amplifikate tragender Sauen harmonisieren mit denen reproduktionsgestörter Sauen, da sowohl *Chlamydophila psittaci* (n = 5) als auch *Chlamydophila abortus* (n = 3) gefunden wurden. Beide Spezies, vor allem aber *Chlamydophila abortus*, lösen offensichtlich nicht zwangsläufig Aborte aus.

5.4 Lokalisation

Chlamydien konnten in allen untersuchten Eileitersegmenten (Ampulle, Isthmus und uterutubale Verbindung) sowie im Uterus fruchtbarkeitsgestörter Sauen nachgewiesen werden, ohne dass gravierende Unterschiede in der Häufigkeit positiver Befunde zu beobachten waren. Offensichtlich besteht kein spezieller Tropismus der Chlamydien für die eine oder

andere Lokalisation innerhalb des weiblichen Genitale. Mit anderen Worten sind Chlamydien in der Lage, alle (hier getesteten) Zellen des weiblichen Genitaltrakts zu kolonialisieren. Diese Fähigkeit ist bekannt, wurde beim Schwein *in vivo* (VANROMPAY et al. 2004) und *in vitro* (GUSEVA et al. 2003) und bei anderen Spezies wie Maus (PHILLIPS et al. 1984) und Meerschweinchen (RANK et al. 2000), aber auch bei der Frau (MARANA et al. 1990, LUCISANO et al. 1992) beschrieben. Da keine Quantifizierung z.B. durch Real-Time PCR erfolgte ist fraglich, ob sich die Chlamydien in ihrer Anzahl in Abhängigkeit von der Lokalisation unterscheiden, wie durch die schrittweise Abnahme der relativen Prävalenzrate (als Ergebnis des IFT) von Uterus bis Ampulle suggeriert wird. Derartige Untersuchungen wären sinnvoll, um die These der aufsteigenden Infektion nach genitalem Eintrag zu untermauern.

5.5 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Eine Endometritis konnte bei 89,2% von 38 untersuchten Sauen diagnostiziert werden. Andere Studien berichten von deutlich niedrigeren Prozentzahlen (KARLBERG et al. 1981, ALMOND et al. 1984, HÖRÜGEL et al. 1991, DALIN et al. 1997, BANGE 2000). Bei 84,2% wurde eine chronische Endometritis festgestellt. Ähnliches ist den Studien von DALIN et al. (1997) und DE WINTER et al. (1995) zu entnehmen, die überwiegend chronisch veränderte Uteri beobachteten. Die chronische Endometritis ist offensichtlich die dominierende uterine Inflammation und als Ursache für Reproduktionsstörungen inklusive wiederholten Umrauschens plausibel. Da nur bei einer Sau (2,6 %) Anzeichen einer akuten Inflammation zu beobachten waren, ist anzunehmen, dass das akute Stadium der Entzündung bei der Sau schnell in das chronische Stadium übergeht (DALIN et al. 2004). Die pathogenetischen Mechanismen und ätiologischen Agenzien, die den Entzündungen jeweils zugrunde lagen, sind nicht nachvollziehbar, da u.a. kein Bezug zu den Ergebnissen der mykotoxikologischen und mikrobiologischen Untersuchungen herzustellen war.

Ein nicht unerheblicher Prozentsatz der untersuchten reproduktionsgestörten Sauen wies entzündete Eileiter auf. Sowohl Ampulle als auch Isthmus waren betroffen. Vergleichbare Studien fehlen in der zugänglichen Literatur. Dass der Eileiter als reproduktionsphysiologisch essenzieller Bestandteil erkranken und Infertilität verursachen kann, ist aus älteren Studien bekannt (HAFEZ u. HAFEZ 2000). Interessant war, dass die Ampullen häufiger entzündlich verändert als die Isthmen waren, wie Gleiches auch bei der Stute beobachtet wurde

(MEDENBACH et al. 1999). Ob die Eileiterampulle des Schweins, wie die der Stute, aufgrund der stärker ausgeprägten Schleimhautzotten empfänglicher für Infektionen ist, bleibt zu klären (MOSIMANN u. KOHLER 1990, MEDENBACH et al. 1999). In Analogie zum Uterus wurden in entzündeten Eileitersegmenten vor allem Immunzellen (Lymphozyten und Plasmazellen, diffus verteilt oder fokal herdförmig angesammelt) beobachtet, die charakteristisch für chronische Infektionen sind. Obwohl auf eine derartige Einteilung verzichtet wurde, erscheint es, dass auch im Eileiter dieser Entzündungstyp dominiert. Uterus und Eileiter harmonisieren dahingehend. Gleiche Ursachen für Entzündungen in beiden Lokalisationen sind wahrscheinlich.

Es bestand kein Zusammenhang zwischen Chlamydienbefund und Entzündung im Uterus und/oder Eileiter, obwohl z.B. die in chronisch entzündeten Eileitern in dieser Studie nachgewiesenen Entzündungszellen auch bei der Frau und beim Meerschwein in entzündlich veränderten, Chlamydia-positiven Tuben zu beobachten waren (PATTON et al. 1989, RANK u. SANDERS 1992, PATTON et al. 1994). Die Ursachen für die fehlende Assoziation von Chlamydien und genitaler Pathologie in dieser Studie ist schwer erklärbar, da in zahlreichen anderen Studien bei verschiedensten Spezies (Mensch: LUCISANO et al. 1992, STERN et al. 1996; Mäuse: KHAMESIPOUR et al. 1994, TUFFREY et al. 1994; Meerschweinchen: RANK et al. 2000; Schweine: VANROMPAY et al. 2004; Pferd: MEDENBACH et al. 1999) eben diese Assoziation auftrat. Da aber – im Sinne einer Präzedenz – auch Untersuchungen bei der Frau vorliegen, in denen kein Zusammenhang zu beobachten war, ist anzunehmen, dass morphologische, histologisch nachweisbare Alterationen nicht immer auftreten (STERN et al. 1996, MOUNT et al. 2001). Als weiteres Beispiel mag die Arbeit von RANK et al. (2000) dienen, die *Chlamydia psittaci* aus Konjunktivitismaterial isolierten und den Erreger Meerschweinchen intravaginal inokulierten. Nur 45 % der Tiere zeigten histopathologische Veränderungen im Eileiter, obwohl bei 80 % der Tiere *Chlamydia psittaci* in dem Organ nachgewiesen werden konnte. Ob sich eine Chlamydiose mit ernsthafter Pathologie entwickelt, wird auch beim Schwein – in Analogie zur Frau – von zahlreichen Faktoren (Genetik, Endokrinologie, Virulenz des Stamms, vorangegangene Infektionen, Zytokinprofil u.a.) abhängig sein (DEBATTISTA et al. 2003).

Sowohl in der Ampulle wie auch im Isthmus konnten intraepitheliale Zysten beobachtet werden, ohne dass ein Zusammenhang zum Vorkommen von Chlamydien hergestellt werden konnte. Derartige Zysten konnten bei Kaninchen nach Behandlung mit Östradiol vor allem im Isthmus provoziert werden (ODOR 1991) und wurden bei Kühen als Folge eines

Hyperöstrogenismus beschrieben (DONALDSEN 1969). Zahlreiche Sauen dieser Studie waren Zearalenon-positiv. Zearalenon verursacht Hyperöstrogenismus beim Schwein (LOPEZ et al. 1988, MEYER et al. 2000). Es ist möglich, dass die beobachteten Zysten Resultat der Wirkung des konsumierten Zearalenons sind. Über deren Bedeutung ist indes nichts bekannt.

5.6 Bakteriologische und mykotoxikologische Untersuchungsergebnisse

Im Rahmen differenzialdiagnostischer Abklärung wurden die Uteri von 41 Sauen der Gruppen I und II mikrobiologisch untersucht. Bei 37 Tieren (90,2%) der Sauen wurden Mikroorganismen im Uterus festgestellt, die zu ca. 75 % der opportun bis obligat pathogenen Flora zuzuordnen waren. Am häufigsten konnten *E.coli* (ohne nähere Typisierung) und anaerobe Sporenbildner isoliert werden. Das in dieser Arbeit ermittelte Erregerspektrum (Tab. 21) harmonisiert mit dem anderer Arbeiten (DE WINTER et al. 1995, BANGE 2000, BUSCH et al. 2000, EGGEMANN et al. 2000) und verdeutlicht, dass eine große Varietät von Bakterien den Uterus des Schweins besiedeln kann. Es bestand kein Zusammenhang zwischen bakteriologischen und histopathologischen Befunden. Obwohl ca. 65 % der Sauen mit Chlamydien im Uterus zeitgleich opportun bis obligat pathogene Mikroorganismen aufwiesen, ist fraglich, ob ein Zusammenhang zweifelsfrei zu etablieren ist. Wäre dem so, ist zu schlussfolgern, dass Chlamydien eher die mikrobiell „vorbelasteten“ Uteri besiedeln, oder *vice versa*.

Es ist unglücklich, dass in dieser Arbeit nur bei 27 der reproduktionsgestörten Sauen Zearalenon in der Galle analysiert wurde, da Schlussfolgerungen dadurch limitiert sind. Bei 21 (77,8 %) der Tiere wurde Zearalenon in einer Konzentration > 50 ng/ml in der Galle festgestellt und in Analogie zu den Ergebnissen von MEYER et al. (2000) als Zearalenon-positiv bewertet werden. Diese Autoren beobachteten, dass Sauen mit genannter Konzentration aus Betrieben stammten, die vermehrt Fruchtbarkeitsprobleme aufwiesen. Zwischen dem Ergebnis der Zearalenon-Analyse und den Ergebnissen aller anderen Untersuchungen (Chlamydien, Bakteriologie, Histologie) bestanden keine Zusammenhänge. Grund dafür ist u.a., dass fast alle der untersuchten Sauen in der einen oder anderen Untersuchung positiv waren und rein mathematisch deshalb keine Korrelationen etabliert werden konnten. Kontrollgruppen sind in späteren Untersuchungen zwingend erforderlich. Im Hinblick auf den Einfluss des Zearalenon auf das Entstehen einer genitalen Chlamydiose sei

dennoch nachfolgende Bemerkung erlaubt: Die Invasivität der Chlamydien ist endokrinologisch, in erster Instanz durch Östradiol und Progesteron, beeinflussbar. Östradiol fördert die Invasivität (d.h. der Anteil infizierter Zellen ist höher), Progesteron inhibiert. Wurden Meerschweinchen mit Östradiol behandelt und anschließend experimentell intravaginal mit Chlamydien infiziert, konnte eine ausgeprägte ascendierende Infektion der Uteri und Eileiter beobachtet werden (RANK et al. 1982). Entsprechende Referenzdaten sind auch aus *in vitro*-Studien unter Verwendung unterschiedlichster Zelllinien verfügbar (GUSEVA et al. 2003). Wie oben erwähnt, besitzt Zearalenon eine östrogene Wirkung. Es sollte deshalb angenommen werden, dass das weibliche Genitale des Schweins bei zeitgleicher Zearalenonexposition gegenüber Chlamydien empfindlicher ist. Diese Hypothese ist zu überprüfen.

5.7 Schlussfolgerungen

In dieser Untersuchung konnte eine hohe Prävalenz genitaler Chlamydien nachgewiesen werden. Zusammen mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen in verschiedenen Regionen Deutschlands und der Schweiz ist zu konstatieren, dass Chlamydien in Zuchtschweinebeständen in Mitteleuropa weit verbreitet sind (BANGE 2000, BUSCH et al. 2000, EGGEMANN et al. 2000, HOELZLE et al. 2000, CAMENISCH et al. 2004, HOTZEL et al. 2004).

Es konnte aufgezeigt werden, dass Chlamydien alle Eileitersegmente und den Uterus infizieren können. Dabei ist zu vermuten, dass die Infektion über den Uterus in die Eileiter ascendiert. Diese These sollte durch die Quantifizierung der Chlamydien unter Verwendung der Real-Time-PCR untermauert werden. Die Bedeutung der Chlamydien im Eileiter konnte nicht gänzlich geklärt werden. Jedoch ist zu vermuten, dass Chlamydieninfektionen die Tubenfunktion beeinträchtigen, da sie prinzipiell die Fähigkeit besitzen, Entzündungen und strukturelle Schäden im Eileiter hervorzurufen, was bei zahlreichen Spezies inklusive dem Menschen sowohl nach natürlicher wie auch artifizieller Infektion gezeigt werden konnte (LUCISANO et al. 1992, KHAMESIPOUR et al. 1994, TUFFREY et al. 1994, STERN et al. 1996, VAN VOORHIS et al. 1997, MEDENBACH et al. 1999, RANK et al. 2000).

Das Vorkommen von Chlamydien im Eileiter und / oder Uterus bei tragenden Sauen lässt schlussfolgern, dass die alleinige Präsenz von Antigen nicht automatisch eine Erkrankung bedeutet. Es ist zu vermuten, dass der Ausbruch der Erkrankung an andere Faktoren gebunden

ist, wie auch beim Rind bereits beschrieben (KALTENBOECK et al. 2005, WEHREND et al. 2005).

In dieser Arbeit wurden die Chlamydienspezies *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia suis* und *Chlamydophila abortus* nachgewiesen. Bis auf *Chlamydia trachomatis* wurden die genannten Spezies bereits in früheren Arbeiten im Genitaltrakt von Schweinen nachgewiesen (SCHILLER et al. 1997, BUSCH et al. 2000, EGGEMANN et al. 2000, HOTZEL et al. 2004, VANROMPAY et al. 2004). Mit dem Nachweis von *Chlamydia trachomatis* im Genitaltrakt von Sauen besteht möglicherweise die Gefahr einer Zoonoseerkrankung. An dieser Stelle sollten sich weitere Studien anschließen.

Die histologischen Untersuchungsergebnisse zeigen überwiegend chronisch entzündete Eileiter und Uteri. Ein direkter Zusammenhang zwischen den histologischen Befunden und dem Nachweis von Chlamydien konnte nicht ermittelt werden. Ob und welche morphologischen bzw. histologisch nachweisbaren Alterationen Chlamydien im Genitaltrakt verursachen können, bleibt ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die bakteriologischen Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, dass Chlamydien eher die mikrobiell „vorbelastete“ Uteri besiedeln, oder *vice versa*. Es bleibt offen, welche Faktoren eine Chlamydieninfektion bzw. den Ausbruch einer klinischen Erkrankung begünstigen könnten und unter welchen Umständen Chlamydieninfektionen eventuell am Infertilitätsgeschehen beteiligt sind.

Weiterführende Arbeiten sind auf dem Gebiet der Chlamydieninfektion zwingend erforderlich. Ziele müssen sein 1) die Bedeutung tubaler Besiedlung mit Chlamydien für Morphologie und Funktion des Eileiters zu bewerten, 2) Faktoren zu identifizieren, die eine genitale Chlamydiose verursachen, 3) Infektionswege zu identifizieren, 4) die Pathogenität einzelner Spezies zu bewerten, 5) die Prävalenz potenziell zoonotischer Chlamydien zu ermitteln und das tatsächliche Gefährdungspotenzial für Menschen einzuschätzen, 6) die Bedeutung der Chlamydien für die Fruchtbarkeit des Schweins bzw. als Infertilitätsursache zu bewerten und 7) ausgehend davon Behandlungs- bzw. Eradikationsprogramme zu erarbeiten.

6 Zusammenfassung

Grit Hoffmann

Vorkommen von Chlamydien in Eileiter und Uterus des Schweines und deren mögliche Bedeutung für das Infertilitätsgeschehen.

Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Juni 2007

(81 Seiten, 29 Tabellen, 15 Abbildungen, 177 Literaturangaben)

Schlüsselwörter: Chlamydien, Schwein, Eileiter, Uterus, Antikörper, PCR

Chlamydien haben ein breites Wirtsspektrum und können vielfältige Krankheitssymptome hervorrufen. Obwohl übereinstimmend angenommen wird, dass Chlamydien Fruchtbarkeitsstörungen bei der Sau verursachen, sind zahlreiche Fragen ungeklärt. So ist bisher unbekannt, ob Chlamydien die Eileiter des Schweines besiedeln und krankhafte Veränderungen hervorrufen können. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, Eileiter reproduktionsgestörter Sauen auf Chlamydien zu untersuchen und deren mögliche Bedeutung als Infertilitätsursache zu eruieren. Zeitgleich wurden auch Uteri beprobt und diversen differenzialdiagnostisch relevanten Analysen unterzogen. Letztlich sollte durch die Bestimmung von Zearalenon in der Galle das differenzialdiagnostische Spektrum vervollständigt werden.

Insgesamt wurden die Genitalorgane von 42 reproduktionsgestörten Sauen (Jungsauen: n=14; Altsauen: n=28; wiederholte Umrausche) aus drei Betrieben auf Chlamydien untersucht. Bei 20 Sauen (Gruppe 1) wurden ein Eileiter und der Uterus, bei weiteren 22 Sauen (Gruppe 2) Ampulle, Isthmus und uterotubale Verbindung beider Eileiter und der Uterus untersucht. Genitalien acht tragender Sauen dienten als Kontrollen. Zum Nachweis von Chlamydien kamen ein kommerzieller IFT (Chlamydia Direct IF Identification) und eine nested PCR (Nachweis des MOMP) mit anschließender Sequenzierung positiver PCR-Produkte zur Anwendung. Eileiter bzw. Eileitersegmente und Uteri wurden histologisch, Uteri

fortpflanzungsgestörter Sauen zudem bakteriologisch untersucht. Bei 27 Sauen erfolgte eine Bestimmung von Gesamt-Zearalenon mittels HPLC in der Gallenflüssigkeit.

Die IFT- und PCR-Ergebnisse differierten erheblich. Mit dem IFT wurden wesentlich mehr positive Ergebnisse als mit der PCR generiert. Bei 30 (60 %) der insgesamt 50 untersuchten Sauen wurden Chlamydien mittels PCR nachgewiesen. In Gruppe I waren 6 (30 %) der Uteri und 7 (35 %) der Eileiter Chlamydia-positiv, während in der Gruppe II 8 (36,4 %) der Uteri und 12 (54,5 %) der Eileiter als positiv befundet wurden. Tragende Tiere wiesen jeweils 3 (37,5 %) Chlamydia-positive Uteri und Eileiter auf. Nur in einem Fall (12,8 %) konnten Chlamydien ausschließlich im Eileiter detektiert werden. Chlamydien wurden uni- oder bilateral in einem oder mehreren Eileitersegmenten ohne oder mit zeitgleicher Besiedlung des Uterus nachgewiesen. Insgesamt wurden 41 spezifische PCR-Amplifikate aus Eileitersegmenten und Uteri von 26 reproduktionsgestörten Tieren der Gruppen I und II und 4 trächtigen Sauen sequenziert. Am häufigsten wurden *Chlamydophila psittaci* (n = 24) und *Chlamydia suis* (n = 10) detektiert. Seltener waren *Chlamydophila abortus* (n = 4) und *Chlamydia trachomatis* (n = 3) festzustellen.

Insgesamt wiesen 34 (89,5 %) von 38 histologisch untersuchten Uteri entzündliche Veränderungen auf, die zu 94,1 % (n=32) chronisch waren. Entzündliche Infiltrationen mit Immunzellen wurden sowohl in Ampullen (47,9 %) als auch Isthmen (22,9 %) der Eileiter beobachtet. Die Uteri enthielten überwiegend zeitgleich mehrerer Bakterien, die als fakultativ bis obligat pathogen zu beurteilen waren. *E. coli* dominierte (78,0%). 21 (77,8 %) Sauen wiesen ≥ 50 ng/ml Gesamtzearealenon auf und wurden als positiv bewertet. Es bestanden keine Zusammenhänge zwischen den Chlamydienbefunden und Ergebnissen der übrigen Untersuchungen.

Es ist zu schlussfolgern, dass Chlamydien unterschiedlichster Spezies Uterus und Eileiter kolonialisieren. Sie sind in der Schweinepopulation vermutlich weit verbreitet. Da auch tragende Sauen Chlamydien im Genitale enthielten, muss eine Infektion nicht zwangsläufig eine In- bzw. Subfertilität verursachen, noch für zu identifizierende Faktoren vermutlich prädisponierend wirken. Chronische Entzündungen der Uteri sind ähnlich häufig wie entzündlich veränderte Eileiter zu beobachten. Eine direkte Assoziation zwischen genitaler Entzündung und Infektion mit Chlamydien war nicht nachweisbar. Entzündungen von Eileiter und Uterus sind als Sterilitätsursache vermutlich bedeutend. Ob Chlamydien strukturelle und/oder funktionelle Eileiter- und Uterusveränderungen verursachen können, bleibt ebenso wie die Risiken für den Menschen abzuklären, die durch potenziell zoonotische Chlamydien wie *Chlamydophila abortus* entstehen können.

7 Summary

Grit Hoffmann

Occurrence of chlamydiae in porcine oviducts and uteri and their potential impact on infertility.

Large Animal Clinic for Theriogenology and Ambulatory Services, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in June 2007

(81 pages, 29 tables, 15 figures, 177 references)

Keywords: chlamydia, swine, fallopian tube, uterus, antibody, PCR

Chlamydiae have a broad spectrum of hosts and can cause numerous disease symptoms. Although it is widely accepted that Chlamydia cause fertility disorders in the sow, many questions remain unanswered. In this respect, it is unknown if chlamydiae colonize swine oviducts and herald the development of disease. Thus, the aim of this study was to investigate the oviducts of sows with reproductive disorders for chlamydiae and to elicit their possible significance as the cause of infertility. At the same time the uteri were sampled and subjected to diverse differential diagnostic analyses. Finally, the differential diagnostic spectrum was to be completed through the determination of zearalenon in the bile.

In total, the genital organs of 42 sows with reproductive disorders (gilts: n=14; sows: n=28; repeated returns to estrus) from three units were investigated for chlamydiae. In 20 sows (group 1) the oviduct and the uterus were investigated, in a further 22 sows (group 2) the ampulla, isthmus and uterotubal junction of both oviducts and the uterus were examined. The genitalia of eight gestating sows served as controls. A commercial IFT (Chlamydia Direct IF Identification) and a nested PCR (MOMP detection) with subsequent positive PCR-product sequencing were used for the detection of chlamydiae. Oviducts, oviduct segments and uteri were examined histologically and the uteri of sows suffering from reproductive disorders underwent additional bacteriological investigation. A determination was achieved in 27 sows from total zearalenon in the bile fluids via HPLC.

The IFT and PCR results differed considerably. The IFT produced significantly more positive results than were generated with the PCR. Chlamydiae were detected using PCR in 30 (60 %) of the in total 50 sows investigated. In Group I 6 (30 %) of the uteri and 7 (35 %) of the oviducts were chlamydia-positive, whilst in group II 8 (36.4 %) of the uteri and 12 (54.5 %) of the oviducts were found to be positive. Gestating animals showed 3 (37.5 %) chlamydia-positive uteri and oviducts, respectively. Only in one case (12.8 %) could chlamydiae be exclusively detected in the oviducts. Chlamydiae were detected uni- or bilaterally in one or more oviduct segments and with or without simultaneous colonization of the uterus. In total, 41 specific PCR-amplifications of the oviduct segments and uteri from 26 animals with reproductive disorders in Groups I and II and 4 gestating sows were sequenced. *Chlamydophila psittaci* (n = 24) and *Chlamydia suis* (n = 10) were detected most frequently. *Chlamydophila abortus* (n = 4) and *Chlamydia trachomatis* (n = 3) were more rarely determined.

In total, 34 (89.5 %) of 38 histologically examined uteri showed inflammatory lesions, that were 94.1 % (n=32) chronic. Inflammatory infiltrations with immune cells were observed both in the ampullae (47.9 %) as well as the isthmuses (22.9 %) of the oviducts. The uteri at the same time predominantly contained numerous bacteria that were judged as being opportune to fastidious pathogens. E.coli dominated (78.0%). 21 (77.8 %) of sows exhibited \geq 50 ng/ml total zearalenon and were evaluated as being positive. There were no associations between the chlamydiae findings and the results of other investigations.

It is to be inferred that diverse species of chlamydiae colonize the uterus und oviduct. They are presumably widespread in the swine population. As the genitalia of gestating sows also contain chlamydiae, an infection is not inevitable in respect of sub fertility and that factors still to be identified presumably have a predisposing effect. Chronic inflammation of the uteri is frequently to be observed as being similar to inflammatory lesions of the oviduct. A direct association between genital infections and chlamydia infections could not be determined. Lesions of the oviduct and uterus are probably significant in causing sterility. Whether or not chlamydiae can cause structural and/or functional lesions of the oviduct and uterus and if this can occur through potentially zoonotic chlamydiae such as *Chlamydophila abortus*, remains to be clarified, just as is the case with the risk to humans.

8 Literaturverzeichnis

1. Allegra L, Blasi F, Centanni S, Cosentini R, Denti F, Raccanelli R, Tarsia P, Valenti V. Acute exacerbations of asthma in adults: role of *Chlamydia pneumonite* infection. *Eur Respir J*. 1994;7(12):2165-8.
2. Almond GW, Bosu WTK, King GJ. The Not-In-Pig (NIP) Sow. In: Proceedings of the 10th ICAR; 1984.p.441-3.
3. Andersen AA, Vanrompay D. Avian Chlamydiosis (Psittacosis, Ornithosis). In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE editors. *Diseases of Poultry*. Ames: Iowa State University Press, 11. Auflage, 2003,S.863-79.
4. Andrews AH, Goddard PC, Wilshire AJ, Dagnell GJR. A chlamydial keratoconjunctivitis in a British sheep flock. *Vet Rec*. 1987;120:238-9.
5. Bagdonas J, Mauricas M, Gerulis G, Petkevicius S, Jokimas J. Evaluation of different laboratory methods for diagnosis of pig chlamydiosis in Lithuania. *Pol J Vet Sci*. 2005;8(1):49-56.
6. Bange U. Immunfluoreszenzmikroskopische, makroskopische, histologische und bakteriologische Untersuchungen an Ovarien und Uteri fortpflanzungsgestörter Sauen unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Chlamydien. [Dissertation med. vet.]. Leipzig, Univ.Leipzig; 2000.
7. Barlow REL, Cooke ID, Odukoya O, Heatley MK, Jenkins J, Narayansingh G, Ramsewak SS, Eley A. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* in fresh tissue specimens from patients with ectopic pregnancy or tubal factor infertility as determined by PCR and in-situ hybridisation. *J Med Microbiol*. 2001;50:902-8.
8. Barwell CF. Some observations on the antigenic structure of psittacosis and lymphogranuloma viruses. I. Preparation and use in complement-fixation tests of antisera from different sources. *Br J Exp Pathol*. 1952;33:1527-34.

9. Bavoil PM, Hsisa R, Ojcius DM. Closing in on Chlamydia and its intracellular bag of tricks. Microbiology. 2000;146:2723-31.
10. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent Chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. Microbiol Rev. 1994;58:686-99.
11. Bisping W, Amtsberg G. Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere. Berlin; Hamburg: Verlag Parey; 1988.p.301-5.
12. Blanco Loizeiler A. Las neo-rickettsiosis animales en Espana. Revista des Patronato de Biologia Animal. 1968; 12:5-22.
13. Bocklisch H, Ludwig C, Lange S. Chlamydien als Abortursache beim Pferd. Berl Münch Tierärztl Wschr. 1991;104:119-24.
14. Bogner KH, Dünninger A, Kaleta EF. Nachweis von Chlamydien bei Psittaziden aus Tupferproben mit verschiedenen Methoden. AVID-Mitteilungen II/1997, Anl.10.
15. Borel N, Doherr MG, Vretou E, Psarrou E, Thoma R, Pospischil A. Chlamydienabort beim Schaf: Untersuchung der Seroprävalenz in der Schweiz mittels eines kompetitiven ELISA (cELISA). Schweiz Arch Tierheilk. 2002;144(9):474-82.
16. Buhi WC, Alvarez IM, Kouba AJ. Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. J Reprod Fertil. 1997;52:285-300.
17. Busch M, Thoma R, Schiller I, Corboz L, Pospischil A. Occurrence of chlamydiae in the genital tracts of sows at slaughter and their possible significance for reproductive failure. J Vet Med B. 2000;47:471-80.
18. Bush RM, Everett KDE. Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. Int J Sys Evol Microbiol. 2001;51:203-20.
19. Caldwell HD, Schachter J. Antigenetic analysis of the major outer membrane protein of Chlamydia spp. Infect Immun. 1982;35:1024-31.

20. Camenisch U, Lu ZH, Vaughan L, Corboz L, Zimmermann DR, Wittenbrink MM, Pospischil A, Sydler T. Diagnostic investigation into the role of Chlamydiae in cases of increased rates of return to oestrus in pigs. Vet Rec. 2004;155(19):593-6.
21. Cavarani S, Cabassi CS, Donofri G, De Iaco B, Taddai S, Flammini CF. Association between *Chlamydia psittaci* seropositivity and abortion in Italian dairy cows. Prev Vet Med. 2001;50:145-51.
22. Chang JJ, Leonhard K, Pitt T. Structural studies of the outer envelop of *Chlamydia trachomatis* by electron microscopy. J Mol Biol. 1982;161:579-90.
23. Chanton-Greutmann H, Thoma R, Corboz L, Borel N, Pospischil A. Aborte beim kleinen Wiederkäuer in der Schweiz: Untersuchungen während zwei Ablammperioden (1996-1998) unter besonderer Beachtung des Chlamydienabortes. Schweiz Arch Tierheilk. 2002;144:483-92.
24. Coles AC. Micro-organisms in psittacosis. Lancet. 1930;i:1011-12.
25. Collier LH. Chlamydia. In: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 8th edition. Published Edward Arnold, London, 1990, p.629-646.
26. Dalin A-M, Gidlund K, Eliasson-Selling L. Post-mortem examination of genital organs from sows with reproductive disturbances in a sow-pool. Acta Vet Scand. 1997;38:253-62.
27. Dalin AM, Kaeoket K, Persson E. Immun cell infiltration of normal and impaired sow endometrium. Anim Reprod Sci. 2004;82-83:401-13.
28. Daniels EK, Woolen NE, Wilson DJ, Phillip RM, Veary T. Investigation the link between chlamydia and perinatal morbidity and mortality in swine herds. Vet Med. 1994;89:157-62.
29. Debattista J, Timms P, Allan J, Allan J. Immunopathogenesis of *Chlamydia trachomatis* infections in women. Fertil Steril. 2003;79(6):1273-87.

30. DeGraves FJ, Gao D, Hehnen H-R, Schlapp T, Kaltenboeck B. Quantitative detection of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* by high-sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle. J Clin Microbiol. 2003;41:1726-29.
31. DeGraves FJ, Kim TY, Jee JB, Schlapp T, Hehnen H-R, Kaltenboeck B. Reinfection with *Chlamydophila abortus* by uterine and indirect cohort routes reduces fertility in cattle preexposed to *Chlamydophila*. Infect Immun. 2004;72:2538-45.
32. De Winter PJJ, Verdonck M, de Kruif A, Devriese LA, Haesebrouck F. Bacterial endometritis and vaginal discharge in the sow: prevalence of different bacterial species and experimental reproduction of the syndrome. Anim Reprod Sci. 1995;37:325-35.
33. Donaldson LE. Effect of continued daily injections of oxytocin in oestrus cycle length and reproductive tract morphology in the cow. J Reprod Fert. 1969;18:259-63.
34. Eggemann G, Wendt M, Hoelzle LE, Jäger C, Weiß R, Failing K. Zum Vorkommen von Chlamydien-Infektionen in Zuchtsauenbeständen und deren Bedeutung für das Fruchtbarkeitsgeschehen. Dtsch.tierärztl.Wschr. 2000;107(1):3-10.
35. Eggert-Kruse W, Rohr G, Kunt B, Meyer A, Wondra J, Strowitzki T, Petzoldt D. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* in subfertile couples. Fert Steril. 2003;80(3):660-3.
36. Everett KDE, Hatch TP. Architecture of the cell envelope of *Chlamydia psittaci*. J Bact. 1995;177:877-82.
37. Everett KDE, Andersen AA. Identification of nine species of the *Chlamydiaceae* using RFLP-PCR. Int J Syst Bacteriol. 1999;49:803-13.
38. Everett KDE, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotyping genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five species, and standards for the identification of organism. Int J Syst Bacteriol. 1999a;49:415-40.

39. Everett KDE, Hornung LJ, Andersen AA. Rapid detection of the *Chlamydiaceae* and other families in the order Chlamydiales: Three PCR tests. J Clin Microbiol. 1999b;37:575-80.
40. Everett KDE. *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. Vet Microbiol. 2000;75:109-26.
41. Fairley S, Chapman S, Livingstone M, Longbottom D. Evaluation of recombinant OMP90A/B for the serodiagnosis of ovine abortion caused by *Chlamydophila abortus*. In: Proceedings of the 4th Meeting of the European Society for *Chlamydia* Research; 2000 Aug 20-23; Helsinki, Finnland.p.100.
42. Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Shames B, Murphy JC. Intracellular Campylobacter-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a Desulfovibrio sp. Vet Rec. 1994;85:54-8.
43. Fritzsche W. Serologische Untersuchungen auf Miyagawanellen-Antikörper bei Rindern in Beziehung zur Reproduktion. Mh Vet-Med. 1966;21:817-25.
44. Glavits R, Molnar T, Rady M. *Chlamydia*-induced abortion in a horse. Acta Vet Hung. 1988;36:33-6.
45. Gonzales GF, Munoz G, Sanchez R, Henkel R, Galleos-Avila G, Diaz-Gutierrez O, Vigil P, Vasquez F, Kortebani G, Mazzolli A, Bustos-Obregon E. Update on the impact of *Chlamydia trachomatis* infection on male fertility. Andrologia. 2004;36:1-23.
46. Graystone JT, Kuo CC, Campell LA, Wang SP. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. Int J Syst Bacteriol. 1989;39:88-90.
47. Grimes JE, Wyrick PB. In: Diseases of Poultry. 9th Edition. Eds. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder Jr. HW. Ames: Iowa State University Press; 1991.p.311-325.

48. Guseva NV, Knight ST, Whittimore JD, Wyrick PB. Primary Cultures of Female Swine Genital Epithelial Cells In Vitro: a New Approach for the Study of Hormonal Modulation of Chlamydial Infection. *Infect Immun*. 2003;71(8):4700-10.
49. Hafez E, Hafez B. Fertilization and cleavage. In: Hafez E, Hafez B, Herausgeber. *Reproduction in Farm animals*. Lippincott Williams & Wilkins 2000:110-25.
50. Halberstaedter L, von Prowazek S. Ätiologie des Trachoms. *Dtsch Med Wochenschr*. 1907;33:1285.
51. Haris JW. Chlamydial antibodies in pigs in Scotland. *Vet Rec*. 1976;98:505-6.
52. Hartley JC, Stevenson S, Robinson AJ, Littlewood JD, Carder C, Cartledge J, et al. Conjunctivitis Due to *Chlamydophila felis* (*Chlamydia psittaci* Feline Pneumonitis Agent) Acquired From a Cat: Case Report with Molecular Characterization of Isolates From the Patient and Cat. *J Infect*. 2001;43:7-11.
53. Hatch TP. Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae? *J Bacteriol*. 1996;178:1-5.
54. Henning K, Sachse K, Sting R. Nachweis von Chlamydien bei einem Stutenabort. *Dtsch Tierärztl Wschr*. 2000;107:49-52.
55. Herfen K, Jäger C, Wehrend A. Genital chlamydial infection in mares and their clinical significance. *Reprod Domest Anim*. 1999;34:20.
56. Hoelzle LE, Steinhausen G, Wittenbrink MM. PCR-based detection of chlamydial infection in swine and subsequent PCR-coupled genotyping of chlamydial omp1-gene amplicons by DNA-hybridization, RFLP-analysis, and nucleotide sequence analysis. *Epidemiol Infect*. 2000;125:427-39.
57. Hopkins JB, Stephenson EH, Storz J, Pierson RE. Conjunctivitis Associated with Chlamydial Polyarthritits in Lambs. *J Am Vet Med Ass*. 1973;163:1157- 60.

58. Hörügel K, Schnurrbusch U, Fischer S. Mould fungus contamination of feedstuff-effects on sow fertility and litter size. *Mh Vet Med.* 1991;46:175-80.
59. Hotzel H, Berndt A, Melzer F, Sachse K. Occurrence of Chlamydiaceae spp. in a wild boar (*Sus scrofa* L.) population in Thuringia (Germany). *Vet Microbiol.* 2004;103(1-2):121-6.
60. Hoyme UB, Bäumler C, Kotani T, Seuffer A. Chlamydia trachomatis-Nachweis bei entzündlichen Erkrankungen der Eileiter. *Geburtsh u Frauenheilk.* 1988;48:876-80.
61. Hunter RHF. Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J Reprod Fert.* 1984;72:203-11.
62. Jee JB, DeGraves FJ, Kim TY, Kaltenboeck B. High prevalence of natural *Chlamydophila* species infection in calves. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5664-72.
63. Jiwakanon J, Persson E, Kaeoket K, Dalin AM. The sow endosalpinx at different stages of the oestrus cycle and at anoestrus: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. *Reprod Domest Animal.* 2005;40(1):28-39.
64. Jones GE. Chlamydial disease: More than just abortion. *Vet J.* 1997;153:249-51.
65. Kaeoket K, Persson E, Dalin AM. Corrigendum to “The sow endometrium at different stages of the oestrus cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system”. *Anim Reprod Sci.* 2002;73:89-107.
66. Kaklikkaya I, Kaklikkaya N, Buruk K, Pulathan Z, Koramaz I, Aydin F, Tosun I, Osman Kilic A, Ozcan F. Investigation of Chlamydia pneumoniae DNA, chlamydial lipopolisaccharide antigens, and Helicobacter pylori DNA in atherosclerotic plaques of patients with aortoiliac occlusive disease. *Cardiovasc Pathol.* 2006;15(2):105-9.
67. Kaltenboeck B, Kousoulas KG, Storz J. Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (*ompA*) genes of the four chlamydial species. *J Bact.* 1993;175:487-502.

68. Kaltenboeck B, Schmeer N, Schneider R. Evidence for numerous *omp1* alleles of porcine *Chlamydia trachomatis* and novel chlamydial species obtained by PCR. J Clin Microbiol. 1997;35:1835-41.
69. Kaltenboeck B, Hehnen HR, Vaglenov A. Bovine *Chlamydophila* spp. Infections: Do We Underestimate the Impact on Fertility? Vet Res Commun. 2005;29(1):1-15.
70. Karlberg K, Rein KA, Nordstoga K. Histological and bacterial examination of uterus from the repeat breeder gilt and sow. Nord Vet. 1981;33:359-65.
71. Kauffold J, Rautenberg T, Gutjahr S, Richter A, Sobiraj A. Ultrasonographic characterization of the ovaries in non-pregnant first served sows and gilts. Theriogenology. 2004a;61:1407-17.
72. Kauffold J, Melzer F, Schulze K, Leiding C, Sachse K, Sobiraj A. Detection of Chlamydia in faeces and semen of boars. In: Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, June 27- July 1 2004b.
73. Kauffold J, Rautenberg T, Hoffmann G, Beynon N, Schellenberg I, Sobiraj A. A field study into the appropriateness of transcutaneous ultrasonography in the diagnoses of uterine disorders in reproductively failed pigs. Theriogenology. 2005;64:1546-58.
74. Kauffold J, Melzer F, Henning K, Schulze K, Leiding C, Sachse K. Prevalence of chlamydiae in boars and semen used for artificial insemination. Theriogenology. 2006;65:1750-8.
75. Khamesipour A, Pal S, Peterson EM, de la Maza LM. Induction of infertility by the *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis biovar in strains of mice that differ in their response to the 60 kDA heat shock protein. J Reprod Fertil. 1994;101:287-94.
76. Kielstein P, Stellmacher H, Horsch F, Martin J. Zur Chlamydieninfektion des Schweines. 1. Mitteilung: Zur experimentellen Chlamydien-Pneumonie des Schweines. Arch Exp Vet Med. 1983;37:569-86.

77. Kölbl O. Untersuchungen über das Vorkommen von Miyagawanellen beim Schwein. Wien tierärztl Mschr. 1969;56:332-5.
78. Leiser R, Zimmermann W, Sidler X, Christen A. Normal-zyklische Erscheinungen im Endometrium und am Ovar des Schweines. Tierärztl Prax. 1988;16:261-80.
79. Leiser R. Weibliche Geschlechtsorgane. In: Mosimann W, Kohler T, editors. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. Berlin, Hamburg: Parey Verlag; 1990.p.232-245.
80. Lenart J, Andersen AA, Rockey DD. Growth and development of tetracycline-resistant *Chlamydia suis*. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(8):2198-203.
81. Leng Z, Moore DE, Mueller BA, Critchlow CW, Patton DL, Halbert SA, Wang S-P. Characterization of ciliary activity in distal Fallopian tube biopsies of women with obstructive tubal infertility. Human Reproduction. 1998;13(11):3121-7.
82. Leonhard I. Untersuchungen über das Vorkommen von *Chlamydia psittaci* in der Lunge und im Kot von gesunden und kranken Schweinen. [Dissertation med. vet.]. Hannover, Univ. Hannover; 1987.
83. Levinthal W. Die Ätiologie der Psittakosis. Klin Wschr. 1930;9:654.
84. Lillie RD. Psittacosis: rickettsia-like inclusions in man and in experimental animals. Public Health Report. 1930;45:773-8.
85. Longbottom D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. J Comp Pathol. 2003;128:217-44.
86. Longbottom D. Chlamydial infections of domestic ruminants and swine: new nomenclature and new knowledge. Vet J. 2004;168:9-11.

87. Lopez TA, Odriozola ER, Milano GD, Sobredo JC, Donadio LH, Rocco JA. Hyperestrogenism in swine due to natural poisoning with zearalenon. *Rev Argent Microbiol.* 1988;20(3):119-23.
88. Lucisano A, Morandotti G, Marana R, Leone F, Branca G, Dell'Acqua S and Sanna A. Chlamydial genital infections and laparoscopic findings in infertile women. *Eur J Epidemiol.* 1992;8(5):645-9.
89. Lyons RA, Saridogan E, Djahanbakhchi O. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Human Reprod Update.* 2006;12:363-72.
90. Mair TS, Wills JM. *Chlamydia psittaci* infection in horses: results of a prevalence survey and experimental challenge. *Vet Rec.* 1992;130:417-9.
91. Marana R, Lucisano A, Leone F, Sanna A, Dell'Acqua S, Mancuso S. High prevalence of silent chlamydia colonization of the tubal mucosa in infertile women. *Fert and Steril.* 1990;53(2):354-6.
92. Mårdh PA, Paavonen J, Puolakkainen M. Diagnosis of chlamydial infections. In: Mårdh PA. *Chlamydia*. New York: Plenum Publishing Corporation; 1989.p.71-99.
93. McChesney AE, Becerra V, England JJ. Chlamydial Polyarthritits in a Foal. *J Am Vet Med Ass.* 1974;165:259-61.
94. McChesney SL, England JJ and McChesney AE. *Chlamydia psittaci* induced pneumonia in a horse. *Cornell Vet.* 1982;72:92-7.
95. Mc Clarty G. Chlamydiae and the biochemistry of intracellular parasitism. *Trends Microbiol.* 1994;5:157-64.
96. McClarty G. Chlamydial metabolism as inferred from the complete genome sequence. In: Stephenson RS, editor. *Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis and immunity*. Washington DC: ASM Press, 1. Auflage, 1999,p.69-100.

97. Medenbach K, Aupperle H, Schoon D, Wittenbrink MM, Schoon HA. Pathology of the equine salpinx. *Pferdeheilk.* 1999;15:560-7.
98. Meyer K, Usleber E, Märtlbauer E, Bauer J. Analysis of zearalenone-metabolites in bile of breeding sows in relation to the reproductive performance. *Berl Münch Tierärztl Wschr.* 2000;113:374-9.
99. Michel G, Salomon FV, Gutte G. *Morphologie landwirtschaftlicher Nutztiere.* Berlin: VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag; 1986.p.311-6.
100. Moore DE, Cates W. Sexually transmitted disease and infertility. In: Holmes KK, Mardh P-A, Sparkling PF, Wiesner PJ, editors. *Sexually transmitted diseases.* New York: McGraw-Hill, 1990:763-71.
101. Moorthy ARS and Spradbrow PB. *Chlamydia psittaci* infection of horses with respiratory disease. *Equine Vet J.* 1978;10:38.
102. Mosimann W, Kohler T. *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere.* Berlin, Hamburg: Parey Verlag; 1990.
103. Moulder JW. Characteristics of chlamydiae. In: Barron A, Turco J, editors. *Microbiology of chlamydia.* Boca Raton, Florida: CRC press, 1988,S.3-20.
104. Moulder JW. Interaction of *Chlamydia* and host cells in vitro. *Microbiol Rev.* 1991;55:143-90.
105. Mount S, Mead P, Cooper K. *Chlamydia trachomatis* in the endometrium: can surgical pathologist identify plasma cells? *Advances in Anatomic Pathology.* 2001;8:327-9.
106. Nagel TC, Tagatz GE, Campell BF. Transmission of *Chlamydia trachomatis* by artificial insemination. *Fertil Steril.* 1986;46:959-60.
107. Niemczuk K, Bednarek D. Chlamydial infection in clinical cases of enzootic bronchopneumonia of calves (EBC): Serological investigations and phenotypic analysis

- of peripheral blood leukocyte subpopulations in affected calves based of flow cytometry (FCM). In: 2. Arbeitstagung des Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Psittakose, Jena 2002.
108. Nixon B, Asquith KL, Aitken RJ. The role of molecular chaperones in mouse sperm-egg interactions. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2005;240:1-10.
109. Odor DL. Light and electron microscopic observations on ciliated vacuoles and cysts in the oviductal and endocervical epithelia of the rabbit. *Am J Anat.* 1991;190(4):334-48.
110. Paavonen J, Eggert-Kruse W. Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update.* 1999;5:433-47.
111. Page LA. Interspecies transfer of psittacosis-LGV-trachoma agents: pathogenicity of two avian and two mammalian strains for eight species of birds and mammals. *Am J Vet Res.* 1966;27:397-407.
112. Page LA, Grimes JE. Avian Chlamydiosis (Ornithosis). In: Hofstad MS, Calnek BW, Helmboldt CF, Reid WM, Yoder HW, editors. *Diseases of Poultry*. Ames: Iowa State University Press, 7. Auflage, 1978.S.337-366.
113. Patton DL and Kuo CC. Histopathology of Chlamydia trachomatis salpingitis after primary and repeated reinfections in the monkey subcutaneous pocket model. *J Reprod Fert.* 1989;85:647-56.
114. Patton DL, Askienazy-Elbhar BD, Henry-Suchet J, Campbell LA, Cappuccio A, Tannous W, Wang S, Kuo C. Detection of *Chlamydia trachomatis* in fallopian tube tissue in women with postinfectious tubal infertility. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;171(1):95-101.
115. Peeling RW, Brunham RC. Chlamydiae as Pathogens: New Species and New Issues. *Emerging Infectious Diseases* 1996;2:307-17.

116. Petersen EE, Clad A. Genitale Chlamydien-Infektionen. Deutsches Ärzteblatt. 1995;92:B205-10.
117. Phillips DM, Swenson CE, Schachter J. Ultrastructure of *Chlamydia trachomatis* infection of the mouse oviduct. J Ultrastruct Res. 1984;88(3):244-56.
118. Piercy DWT, Griffiths PC, Teale CJ. Encephalitis related to *Chlamydia psittaci* infection in a 14-week-old calf. Vet Rec. 1999;144:126-8.
119. Popovici V and Hiastru F. Izolanea microorganismelor din grupul *Bedsonia* de la cabaline. Rev Med Vet. 1968;11:56-60.
120. Pospischil A. Animal chlamydiosis. In: Proceedings of the fifth meeting of the European society for chlamydial research; 2004.p.285-92.
121. Pospischil A, Guscetti F, Thoma R. Chlamydia in pigs. Proceedings of the 15th IPVS Congress; 1998 July 5-9; Birmingham, England.p251.
122. Pospischil A, Thoma R, Hilbe M, Grest P, Zimmermann D, Gebbers JO. Abort beim Menschen durch *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). Schweiz Arch Tierheilk. 2002a;144:463-6.
123. Pospischil A, Thoma R, von Bomhard W, Reitt K, Cantieni J, Zimmermann D, et al. Abort beim Rind durch *Chlamydia psittaci*. Schweiz Arch Tierheilk. 2002b;144:467-72.
124. Rank RG, Harold JW, Aubrey JH, James NP, Almen LB. Effect of Estradiol on Chlamydial Genital Infection of Female Guinea Pigs. Infect Immun. 1982;38(2):699-705.
125. Rank RG, Sanders MM. Pathogenesis of endometritis and salpingitis in a guinea pig model of chlamydial genital infection. Am J Pathol. 1992;140(4):927-36.

126. Rank RG, Bowlin AK, Kelly KA. Characterization of lymphocyte response in the female genital tract during ascending chlamydial genital infection in the guinea pig model. *Infect Immun.* 2000;68:5293-8.
127. Rasmussen SJ, Eckmann L, Quayle AJ, Shen L, Zhang YX, Anderson DJ, et. al. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest.* 1997;99:77-87.
128. Rockey DD, Fisher ER, Hackstadt T. Temporal analysis of the developing *Chlamydia psittaci* inclusion by use of fluorescence and electron microscopy. *Infect Immun.* 1996;64:4269-78.
129. Sachse K, Großmann E. Chlamydienerkrankungen der Nutz- und Haustiere – Zoonotisches Potential der Erreger und diagnostische Fragen. *Dtsch tierärztl Wschr.* 2002;109(4):142-8.
130. Sarma DK, Tamuli MK, Rahman T, Boro BR, Deka BC, Rajkonwar CK. Isolation of chlamydia from a pig with lesions in the urethra and prostata gland. *Vet Rec.* 1983;112:525.
131. Schachter J. The intracellular life of *Chlamydia*. In: Schachter J, editor. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 1988.p.109-39.
132. Schachter J. Chlamydiae. In: Balows A, Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington: American Society of Microbiology; 1991.p.1045-53.
133. Schiller I, Koesters R, Weilenmann R, Kaltenboeck B, Pospischil A. Polymerase Chain Reaction (PCR) Detection of Porcine *Chlamydia trachomatis* and Ruminant *Chlamydia psittaci* Serovar 1 DNA in Formalin-Fixed Intestinal Specimens from Swine. *J Vet Med B.* 1997a;44:185-91.
134. Schiller I, Koesters R, Weilenmann R, Thoma R, Kaltenboeck B, Heitz P, Pospischil A. Mixed infections with porcine *Chlamydia trachomatis/pecorum* and infections with

- ruminant *Chlamydia psittaci* serovar 1 associated with abortions in swine. Vet Microbiol. 1997b;58:251-60.
135. Schnorr B. Embryologie der Haustiere. 3rd edition. Stuttgart: Enke; 1996.
136. Schnurrbusch U, Bergfeld J, Brüssow KP, Kaltoven U. Schema zur Ovarbeurteilung beim Schwein. Mh Vet Med. 1981;36:811-5.
137. Schummer, A, Vollmerhaus B. Weibliche Geschlechtsorgane des Schweines. In: Habermehl, K-H, Vollmerhaus B, Wilkens H, editors. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. 7th ed. Berlin, Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag; 1995.p.403-406.
138. Selbitz HJ. Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie. Jena, Stuttgart: Fischer Verlag; 1992.p.251-56.
139. Shepard MK, Jones RBJ. Recovery of *Chlamydia trachomatis* from endometrial and fallopian tube biopsies in women with infertility of tubal origin. Fertil Steril. 1989;52:232-8.
140. Sherban GP, Firsova GD, Pirogova WA, Kobylenkova NN, Einoveva NT. Virus abortion in swine. Veterinarija. 1972;36:40-2.
141. Sherban GP, Firsova GD, Voskrenskaya TG. Chlamydial infection in swine. Veterinarija. 1978;42:55-8.
142. Sherman JK, Jordan GW. Cryosurvival of *Chlamydia trachomatis* during cryopreservation of human spermatozoa. Fertil Steril. 1985;43:664-6.
143. Smollich A, Michel G. Mikroskopische Anatomie der Haustiere. 2nd ed. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1992.p.299-315.
144. Sriram S, Ljunggren-Rose A, Yao SY, Whetsell WO. Detection of chlamydial bodies and antigens in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. J Infect Dis. 2005;192(7):1219-28.

145. Stellmacher H, Kielstein P, Horsch F, Martin J. Zur Bedeutung der Chlamydien-Infektion des Schweines unter besonderer Berücksichtigung der Pneumonien. *Monatsh Veterinärmed.* 1983;38:601-6.
146. Stephens RS, Tam MR, Kuo CC, Nowinski RC. Monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis*: antibody specificities and antigen characterization. *J Immunol.* 1982;128:1083-9.
147. Stern RA, Svoboda-Newman SM, Frank TS. Analysis of chronic endometritis for *Chlamydia trachomatis* by polymerase chain reaction. *Hum Pathol.* 1996;27:1085-8.
148. Storz J. In: *Chlamydia and Chlamydia-Induced Diseases*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, USA, 1971.
149. Storz J, Kaltenboeck B. The Chlamydiales. In: Woldehiwet Z, Ristic M, editors. *Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals*. Oxford: Pergamon Press; 1993.p.27-55.
150. Szeredi L, Hotzel H, Sachse K. High Prevalence of Chlamydial (*Chlamydophila psittaci*) Infection in Fetal Membranes of Aborted Equine Fetuses. *Vet Res Commun.* 2005;29(1):37-49.
151. Teankum K, Pospischil A, Janett F, Brugnera E, Hoelzle LE, Hoelzle K, Weilenmann R, Zimmermann DR, Gerber A, Polkinghorne A, Borel N. Prevalence of chlamydiae in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks. *Theriogenology.* 2007;67(2):303-10.
152. Thoma R, Guscetti F, Schiller I, Schmeer N, Corboz L, Pospischil A. Chlamydiae in porcine abortion. *Vet Pathos.* 1997;34:467-9.
153. Tuffrey M, Alexander F, Inman C and Ward ME. Correlation of infertility with altered tubal morphology and function in mice with salpingitis induced by a human genital-tract isolate of *Chlamydia trachomatis*. *J Reprod Fert.* 1990;88:295-305.

154. Tuffrey M, Woods C, Inman C, Ward M. The effect of a single oral dose of azithromycin on chlamydial infertility and oviduct ultrastructure in mice. *J Antimicrob Chemoth.* 1994;34:989-99.
155. Tyczka J, Jäger C. Molekulare Typisierung von 76 *Chlamydophila*-Isolaten vom Wiederkäuer mittels PCR-RFLP. In: 2. Arbeitstagung des Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Psittakose, Chlamydien bei Rindern und Schweinen und ihr zoonotisches Potenzial, Jena 2002.
156. Vanrompay D, Geens T, Desplanques A, Hoang TQ, De Vos L, Van Loock M, et. al.. Immunoblotting, ELISA and culture evidence for *Chlamydiaceae* in sows on 258 Belgian farms. *Vet Microbiol.* 2004;99:59-66.
157. Vanrompay D, Hoang TQ, De Vos L, Verminnen K, Harkinezhad T, Chiers K, Morre SA, Cox E. Specific-pathogen-free pigs as an animal model for studying *Chlamydia trachomatis* genital infection. *Infect Immun.* 2005;73(12):8317-21.
158. Vanrompay D, Lyons JM, Morre SA. Animal models for the study of *Chlamydia trachomatis* infections in the female genital infection. *Drugs Today (Barc)* 2006;42 Suppl A:55-63.
159. Van Voorhis WC, Barrett LK, Sweeney YT, Kuo CC, Patton DL. Repeated *Chlamydia trachomatis* infection of *Macaca nemestrina* fallopian tubes produces a Th1-like cytokine response associated with fibrosis and scarring. *Infect Immun.* 1997;65:2175-82.
160. Veznik Z, Svecova D, Pospisil L, Diblikova I. Detection of *Chlamydia* spp. in animal and human semen by direct immunofluorescence. *Vet Med (Praha)* 1996;41:201-6.
161. Wehr J, Deuter H, Meyer H. Klinisch-epizootiologische Untersuchungen zur Chlamydiainfektion in einem Kälber- und einem Jungrinderbestand. *Mh Vet-Med.* 1985;40:508-11.

162. Wehrend A, Failing K, Hauser B, Jager C, Bostedt H. Production, reproductive, and metabolic factors associated with chlamydial seropositivity and reproductive tract antigens in dairy herds with fertility disorders. *Therio*. 2005;63:923-30.
163. Weisburg WG, Hatch TP, Woese CR. Eubacterial origin of Chlamydiae. *J Bacteriol*. 1986;162:570-4.
164. Wildführ G, Wildführ W. Chlamydien. In: Wildführ G, Wildführ W, editors. *Medizinische Mikrobiologie*. 2nd ed. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit; 1979.p.297-302.
165. Wills JM, Watson G, Lusher M, Mair TS, Wood D and Richmond SJ. Characterisation of *Chlamydia psittaci* isolated from a horse. *Vet Microbiol*. 1990;24:11-9.
166. Wittenbrink MM. Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydien beim Schwein mit Hilfe eines Immunofluoreszenz- und eines Enzymimmunotests. *Berl Münch Tierärztl Wschr*. 1991a;104:270-5.
167. Wittenbrink MM, Wen X, Böhmer N, Amtsberg G, Binder A. Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Chlamydia psittaci* in Organen von Schweinen und abortierten Schweinefeten. *J Vet Med B*. 1991b;38:411-20.
168. Wittenbrink MM, Schoon HA, Bisping W, Binder A. Infection of the bovine genital tract with *Chlamydia psittaci* as a possible cause of infertility. *Repro Dom Anim*. 1993;28:129-36.
169. Wittenbrink MM, Kirpal G, Thiele D, Fischer D, Krauss H, Bisping W. Detection of *Chlamydia psittaci* in vaginal discharge of cows: a necessary enlargement of bacteriologic diagnosis for the etiologic clarification of fertility disorders in the female cow. *Zentralbl Veterinärmed B*. 1994;41:492-503.
170. Wittenbrink MM. Aetiological significance of chlamydial infections in equine reproductive disorders? *Pferdeheilkunde* 1999;15:538-40.

171. Wolner-Hansen P, Kiviat NB, Holmes KK. Atypical pelvic inflammatory disease: subacute, chronic, or subclinical upper genital tract infection in women. In: Holmes KK, Mardh P-A, Sparkling PF, Wiesner PJ, editors. Sexually transmitted diseases. New York: McGraw-Hill, 1990:615-21.
172. Woollen N, Daniels EK, Yeary T, Leipold HW, Phillips RM. Chlamydial infection and perinatal mortality in a swine herd. J Am Vet Med Ass. 1990;197:600-1.
173. Wyrick PB, Richmond SJ. Biology of chlamydiae. J Am Vet Med Assoc. 1989;195:1507-12.
174. Zana J, Thomas D, Muffat-Joly M, De Brux J, Pocidalo JJ, Orfila J, et al. An experimental model for salpingitis due to *Chlamydia trachomatis* and residual tubal infertility in the mouse. Hum Reprod. 1990;5:274-8.
175. Zeng Z, Moore DE, Mueller BA, Critchlow CW, Patton DL, Halbert SA, Wang S-P. Characterization of ciliary activity in distal Fallopian tube biopsies of women with obstructive tubal infertility. Human Reprod. 1998;13:3121-7.
176. Zimmermann W, Plonait H. Chlamydieninfektionen. In: Waldmann KH, Wendt M, editors. Lehrbuch der Schweinekrankheiten. 4th ed. Berlin: Parey Buchverlag; 2001.p.142.
177. Anon. Chlamydiosen (Teil 2): Erkrankungen durch *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pneumoniae*. 2001 (zitiert vom 01.12.2006), <http://www.rki.de/nn_225576/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Rat__Chlamydia__Teil2.html>

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Axel Sobiraj für die freundliche Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit.

Besonders herzlich danken möchte ich Priv. Doz. Dr. Johannes Kauffold, der mir allzeit kompetente und hilfreiche Unterstützung bei der praktischen Versuchsdurchführung und bei der Formulierung dieser Arbeit entgegenbrachte.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung bedanke ich mich bei Herrn Andreas Richter. Desweiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Chlamydien des Friedrich-Loeffler-Institutes in Jena und allen Mitarbeitern der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, die mich während der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Thomas für die Geduld, Toleranz und die aufbauenden Worte, die sie mir während der Anfertigung dieser Arbeit entgegengebracht haben.